

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS - RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAITRISE EN PHYSIQUE

PAR
NASR - EDDINE CHERID

MISE AU POINT D'UN SYSTEME DE MESURE POUR ETUDIER LES
PROPRIETES D'ABSORPTION ET DE FLUORESCENCE
A L'INTERFACE AIR - EAU

FEVRIER 1992

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RESUME

La photosynthèse est le processus par lequel les plantes vertes et les algues convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique . Les pigments responsables de l'absorption de l'énergie lumineuse et de la transduction énergétique se situent dans la bicouche protéino-lipidique de la membrane . Une des caractéristiques de l'état physique de ces pigments est leur orientation intrinsèque . Afin de simuler ladite orientation , il devient intéressant d'étudier des systèmes modèles monomoléculaires et de les caractériser par des études d'absorption et de fluorescence mesurées directement à l'interface air-eau .

Nous avons réussi à mettre au point un appareil inédit permettant de mesurer directement les propriétés optiques de la chlorophylle *a* à l'interface air-eau . Ainsi , la mesure du spectre d'absorption couvrant la région de 400 à 800 nm est suivie de celle du spectre de fluorescence pour la même monocouche de chlorophylle *a* . La stabilité sur l'absorbance à 500 nm de la dite monocouche comprimée à 20 mN m⁻¹ et laissée en équilibre près d'une heure est de l'ordre de 1×10^{-4} (u.a.) ; le bruit à 500 nm est de 1×10^{-5} (u.a.). Les mesures expérimentales nous ont permis d'observer un rapport signal sur bruit de 0.31×10^2 dans la région des longueurs d'onde de 620 à 660 nm pour la fluorescence , ce qui en fait le système le plus précis actuellement selon nos connaissances .

Nous avons aussi mesuré les propriétés optiques pour le mélange binaire chlorophylle *a* - phosphatidylcholine d'oeuf à l'interface air-eau . Ces propriétés reproduisent celles mesurées pour le même mélange binaire en films ultra-minces sur support solide , soit les films Langmuir-Blodgett .

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de mémoire monsieur R.M. Leblanc pour son soutien et pour son suivi durant toute la période de la maîtrise .

Je désire remercier également , monsieur Alain Tessier pour ses idées et ses compétences en instrumentation , ainsi que monsieur Gaétan Munger pour son aide à la préparation des films Langmuir-Blodgett .

Je m'en voudrais d'oublier l'excellent travail fourni par l'équipe de l'atelier de mécanique de l'U.Q.T.R. ainsi que les nombreux conseils en technique de fabrication donnés par monsieur Dany Lemay .

Mes remerciements vont également à tous mes collègues du Centre de recherche en photobiophysique pour leur disponibilité et leur collaboration .

TABLE DES MATIERES

	PAGE
RESUME.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIERES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTES DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS.....	x
 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Biomembrane naturelle.....	1
1.2 Biomembrane artificielle.....	8
1.3 But du mémoire.....	10
 2 METHODOLOGIE EXPERIMENTALE.....	11
2.1 Produits chimiques utilisés.....	11
2.2 Technique des monocouches.....	17
2.2.1 Préparation d'une monocouche.....	18
2.2.2 Préparation des films de Langmuir-Blodgett.....	21
 3 SYSTEME DE MESURE DES PROPRIETES OPTIQUES	
A L'INTERFACE AIR-EAU.....	24
3.1 Conception et mise au point du système.....	24
3.1.1 Généralités.....	24
3.1.2 Système de mesure de l'absorption.....	36

3.1.3	Système de mesure de fluorescence.....	43
3.2	Caractéristique du système.....	46
3.2.1	Spécifications du système de mesure d'absorption.....	46
3.2.2	Spécifications du système de mesure de fluorescence.....	51
4	RESULTATS ET DISCUSSION.....	54
4.1	Interprétation des spectres d'absorption.....	55
4.1.1	Cas de la Chl <i>a</i> pure.....	55
4.1.2	Cas de dilution de la Chl <i>a</i> par la Pc d'oeuf (1:10).....	60
4.2	Interprétation des spectres de fluorescence.....	63
4.2.1	Cas de la Chl <i>a</i> pure.....	63
4.2.2	Cas de dilution de la Chl <i>a</i> par la Pc d'oeuf (1:10).....	66
5	CONCLUSION.....	70
6	BIBLIOGRAPHIE.....	71

LISTE DES FIGURES

	PAGE
Figure. 1.1 : Schéma représentant la membrane du chloroplaste.....	3
Figure. 1.2 : Membrane du thylacoïde	5
Figure. 1.3 : Schéma du modèle de la mosaïque fluide d'une membrane.....	6
Figure. 2.1 : Structure de la molécule de Chl <i>a</i>	14
Figure. 2.2 : Représentation schématique de l'orientation des molécules en monocouches avant (1) et après (2) compression.....	20
Figure. 2.3 : Dépôt d'une monocouche sur un solide hydrophile.....	23
Figure. 3.1 : Schéma du triple bain.....	25
Figure. 3.2 : Schéma détaillé de la balance de Langmuir.....	26
Figure. 3.3 : Transducteur magnétique linéaire.....	30
Figure. 3.4 : Courbe de calibration du bain de Langmuir.....	35
Figure. 3.5 : Schéma optique du système de mesure de l'absorption.....	37
Figure. 3.6 : Circuit de stabilisation de la photodiode.....	38
Figure. 3.7 : Convertisseur courant-tension.....	40
Figure. 3.8 : Schéma optique du système de fluorescence.....	44

Figure. 3.9 : Spectre de référence à l'aide d'un laser He-Ne comme source de lumière.....	49
Figure. 3.10: L'absorbance en fonction du temps pour une longueur d'onde fixe de 500 nm.....	50
Figure. 3.11: Spectre de fluorescence à l'interface air-eau sans monocouche pour vérifier le signal Raman.....	53
Figure. 4.1 : Spectre d'absorption d'une monocouche de Chl <u>a</u> à l'interface air-eau.....	58
Figure. 4.2 : Spectre d'absorption de la Chl <u>a</u> pour un film L-B.....	59
Figure. 4.3 : Spectre d'absorption d'une monocouche du mélange Chl <u>a</u> -Pc (1:10) à l'interface air-eau.....	62
Figure. 4.4 : Spectre de fluorescence d'une monocouche de Chl <u>a</u> à l'interface air-eau.....	64
Figure. 4.5 : Spectre de fluorescence de la Chl <u>a</u> pour un film L-B.....	65
Figure. 4.6 : Spectre de fluorescence d'une monocouche du mélange Chl <u>a</u> -Pc (1:10) à l'interface air-eau.....	68
Figure. 4.7 : Spectre de fluorescence du mélange Chl <u>a</u> -Pc (1:10) pour un film L-B.....	69

LISTE DES TABLEAUX

	PAGE
Tableau. 3.1 : Calibration du système de balancier.....	34
Tableau. 3.2: Spécifications du système de mesure d'absorption.....	48
Tableau. 3.3 : Spécifications du système de mesure de fluorescence.....	52
Tableau. 4.1 : Position des maximums d'absorption de la Chl <i>a</i>	57

LISTE DES ABREVIATIONS

Chl a	: Chlorophylle a
Pc	: Phosphatidylcholine
L-B	: Langmuir-Blodgett
P	: Pression de surface
V	: Voltage
g	: Accélération gravitationnelle
L	: La distance effective du fil de torsion
L ₁	: La longueur effective du flotteur
L ₂	: La distance effective du fil de torsion au flotteur de nylon
m	: Pente
M	: Masse
θ	: Déviation
k	: Constante de torsion du fil
I _r	: Intensité du faisceau de référence
I _e	: Intensité de la radiation transmise
I ₀	: Intensité de la lumière incidente
a	: Absorptivité molaire
b	: Épaisseur d'une couche (monocouche)
c	: Concentration molaire
A	: Absorbance de l'échantillon
PS I	: Photosystème I
PS II	: Photosystème II
ATP	: Adénosine triphosphate

NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ADP :	Adénosine diphosphate
u.a. :	Unité Arbitraire
γ_0 :	Tension superficielle de l'eau pure
γ	Tension superficielle de l'eau en présence du film monomoléculaire

INTRODUCTION

1.1 Biomembrane naturelle

Photosynthèse

La photosynthèse est le mécanisme par lequel les plantes vertes et les algues convertissent l'énergie solaire en énergie chimique utilisable par les êtres vivants . Elle représente le phénomène principal par lequel la vie et la lumière interagissent . Sous l'influence de l'énergie solaire , les plantes produisent , à partir de gaz carbonique et d'eau , les hydrates de carbone nécessaires à leur développement ainsi que l'oxygène moléculaire .

La photosynthèse peut se résumer de la façon suivante : l'énergie lumineuse , absorbée par la chlorophylle (Chl *a*), est utilisée pour extraire les électrons de l'eau et augmenter leur potentiel réducteur à un niveau requis pour la réduction du dioxyde de carbone . Dans ce procédé , le phosphate inorganique forme un ester avec l'adénosine diphosphate (ADP) pour donner l'adénosine triphosphate (ATP) qui sera utilisée , conjointement au potentiel réducteur créé sous forme de NADPH , pour la réduction du CO₂ en sucres via le cycle de "Calvin" (Arnon , 1987) . Grossièrement , la réaction globale peut s'exprimer ainsi ,



1.1

L'ensemble des réactions chimiques débutant par l'absorption de l'énergie lumineuse et conduisant à la libération de l'oxygène moléculaire ont lieu dans la membrane interne du chloroplaste .

Structure du chloroplaste

L'appareil photosynthétique des plantes vertes et des algues se localise dans un organe de la cellule appelé chloroplaste . Ce dernier possède habituellement une forme globulaire ou discoïde . Sa taille varie dans un intervalle de un à dix micromètres de diamètre (Alberts et al. 1983) . Sa structure , telle que présentée dans la figure 1.1 , se compose d'une double membrane (interne et externe) . La membrane externe forme la paroi cellulaire . Par contre , la membrane interne , qui contient les pigments photosynthétiques , constitue un réseau organisé formé du stroma et de grana. La disposition des thylacoïdes dans le réseau membranaire se présente sous un arrangement ordonné . On observe l'empilement de thylacoïdes les uns sur les autres pour former une structure organisée , le granum . Il existe de nombreux grana par chloroplaste , chaque granum est relié à un autre granum par une lamelle intergranaire . Les grana contiennent tous les pigments et enzymes nécessaires aux réactions primaires de la photosynthèse .

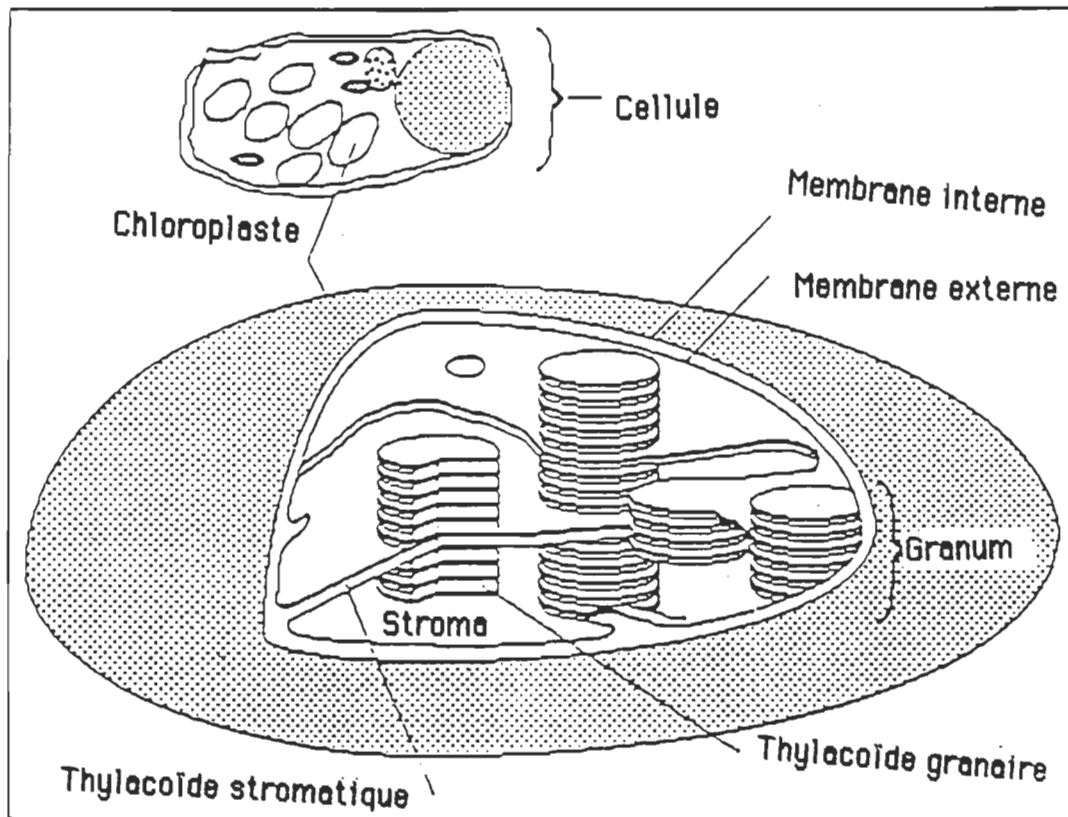


Figure. 1.1 : Schéma représentant la membrane du chloroplaste
(Tazi , 1991)

Structure de la membrane du thylacoïde

Les thylacoïdes présentent une structure bien ordonnée à l'intérieur du système membranaire . Ils contiennent des lipides , des protéines et des pigments (Clayton , 1980 ; Lehninger , 1970) . Parmi les pigments , on retrouve entre autres la Chl *a* , la Chl *b* et les caroténoïdes . Il existe deux types de thylacoïdes comme le montre la figure 1.1 , le premier est une membrane se refermant sur elle-même et ayant une forme de sac aplati tandis que l'autre est relié à la paroi de la membrane interne du chloroplaste et n'a pas la forme d'un disque . Les premiers sont appelés thylacoïdes granaires et les seconds , thylacoïdes stromatiques . La figure 1.2 présente par ailleurs la structure d'un thylacoïde . Cette structure est constituée essentiellement d'une bicouche lipidique , en accord avec le modèle membranaire généralisé de Singer et Nicholson (mosaïque fluide) , voir figure (1.3) . Ce modèle présente la membrane comme une bicouche dont les lipides s'orientent de façon à ce que les têtes polaires , représentées par des petits cercles (partie hydrophile) , soient en contact avec les phases aqueuses , alors que les chaînes grasses (partie hydrophobe) forment une barrière hydrophobe au centre de la bicouche . Les protéines du thylacoïde peuvent la traverser entièrement , partiellement ou seulement s'y fixer , selon la nature de la bicouche . Cette bicouche contient tout le matériel nécessaire pour effectuer la transduction d'énergie lumineuse en énergie chimique . On identifie deux types de complexes thylacoïdaux où la transduction énergétique a lieu , soit le PSI et le PSII .

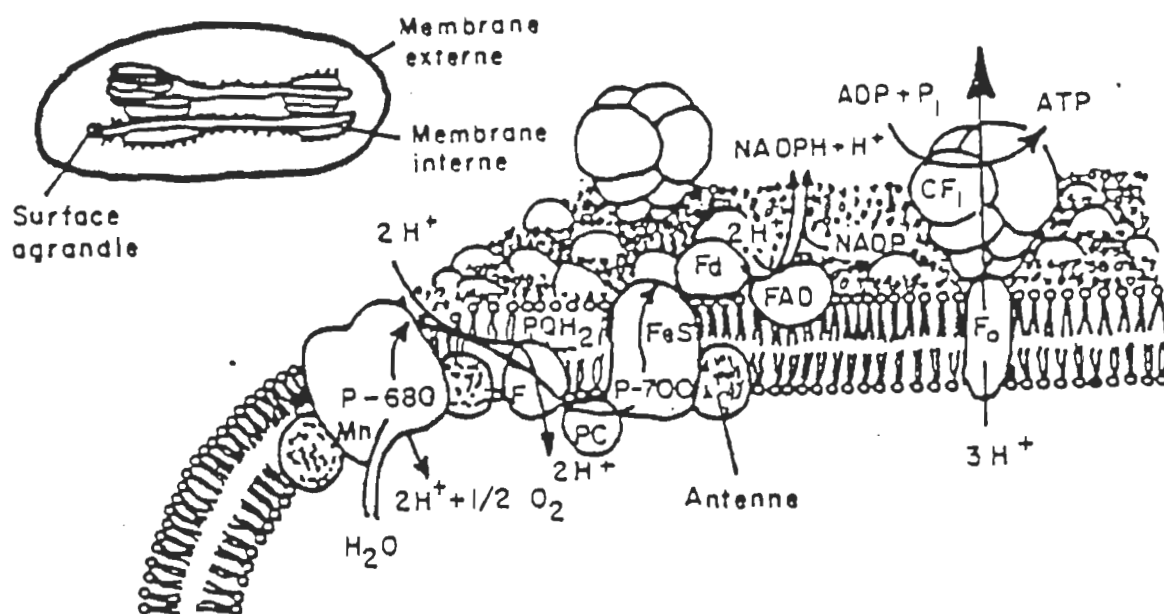


Figure. 1.2 : Membrane du thylacoïde (Nobel , 1983)

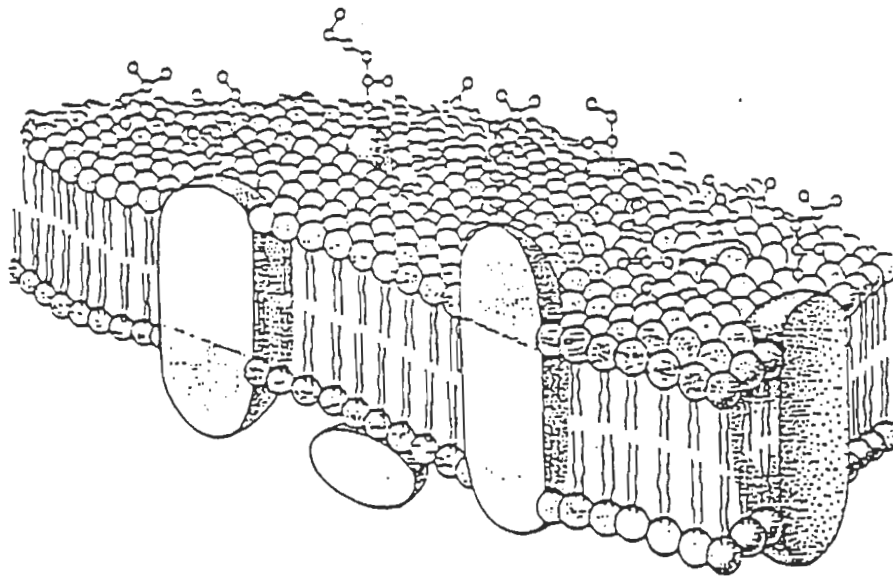


Figure. 1.3 : Schéma du modèle de la mosaïque fluide d'une membrane
(Lehninger , 1982)

Le transfert et la migration d'énergie à travers la membrane photosynthétique

Le rôle principal des pigments photosynthétiques est d'absorber l'énergie lumineuse ; cette dernière étant recueillie par deux antennes collectrices est transférée aux centres réactionnels PS I et PS II via une série de transfert d'énergie (Velthuys , 1980) . Au niveau du PS II , nous retrouvons le centre réactionnel P_{680} formé d'une paire spéciale de chlorophylle a , site où se produit une séparation de charges . Un électron est injecté dans la chaîne de transport d'électrons , tandis qu'un autre provient du site d'oxydation de l'eau par l'action du mécanisme de formation de l'oxygène et comble le trou laissé vacant au P_{680} . L'électron du PS II passe par différents accepteurs pour arriver finalement au centre réactionnel du PS I (P_{700}) . Une séparation de charges se produit aussi au niveau du P_{700} et d'autres accepteurs transportent cet électron , qui va finalement servir pour la production du NADPH . Nous avons donc une démonstration que les pigments ont la capacité de convertir l'énergie lumineuse captée par les antennes collectrices en énergie chimique nécessaire à la réduction du gaz carbonique .

L'orientation des pigments photosynthétiques

La structure des membranes du thylacoïde pose une difficulté dans la compréhension du fonctionnement coordonné des deux photosystèmes .

Nous savons que les différents pigments photosynthétiques sont organisés en deux ensembles fonctionnels (PSI et PSII) et que ces deux

photosystèmes diffèrent l'un de l'autre par la composition peptidique ; cependant nous ne connaissons pas l'emplacement exact des chromophores (chlorophylles , phéophytine , caroténoïdes , etc.) dans les complexes protéiniques ainsi que l'état sous lequel on les retrouve . La conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique dépend étroitement de l'organisation moléculaire des membranes photosynthétiques et plus particulièrement de l'architecture des complexes pigments-protéine (Thornber et al.1987) . À l'aide de la méthode du dichroïsme linéaire nous pouvons déterminer la position des moments de transition des molécules rattachées aux protéines intrinsèques (Thornber et al. 1979) . Cela nous permet d'obtenir des renseignements sur l'orientation des molécules dans la membrane photosynthétique des thylacoïdes .

1.2 Biomembrane artificielle

Systèmes modèles

Les résultats des études in vivo de molécules aussi importantes que les chlorophylles ou les galactolipides sont souvent difficiles à interpréter étant donné la complexité du système étudié . Il devient intéressant de proposer des systèmes modèles pour connaître le comportement caractéristique des molécules biologiques . Ces modèles utilisent la Chl *a* , molécule la plus directement impliquée dans la capture du photon et le transport de l'énergie électromagnétique vers le centre réactionnel . D'une façon générale , les spectroscopies d'absorption et d'émission serviront à examiner les

membranes artificielles . La littérature (Picard et al. 1986 ; Silver , 1985) nous propose plusieurs systèmes modèles pour l'étude des propriétés photophysiques de la Chl *a* , parmi lesquels citons les solutions , les cristaux liquides , les vésicules , les liposomes , les micelles , les monocouches et les films L-B . Ces deux dernières techniques rencontrent trois exigences de base pour modéliser les membranes naturelles :

- 1-atteindre une concentration de chlorophylle *a* de 1 M : c'est la concentration de pigments dans la membrane naturelle ;
- 2-ne mettre en présence que des constituants de la membrane photosynthétique ;
- 3-pouvoir orienter les pigments .

Donc , la technique des monocouches déposées à la surface de l'eau et celle des films L-B ont été sélectionnées en raison de ces trois contraintes expérimentales . Depuis le développement du bain de Langmuir , les études en monocouche se sont multipliées et aujourd'hui , plusieurs domaines , dont la photosynthèse , bénéficient de ces modèles membranaires . Les avantages de l'étude des molécules biologiques par l'entremise de systèmes modèles sont nombreux . Les caractéristiques physiques des constituants purs sont établies, puis la complexité du système augmente peu à peu en y ajoutant de nouvelles composantes membranaires , en proportions désirées . Ainsi , le système des monocouches ou des films L-B simule une demi-membrane biologique . En plus de caractériser l'organisation lipidique , les études en monocouche permettent aussi de déterminer la mobilité des lipides et

d'identifier les interactions entre les lipides et les substances dissoutes dans la sous-phase . Cependant , la plus grande difficulté de la recherche en monocouche est la propreté du matériel utilisé ainsi que la pureté des constituants étudiées . Généralement , la présence de contaminants tensioactifs affecte les caractéristiques physiques de la monocouche à un point tel que les résultats sont souvent inutilisables .

1.3 But du mémoire

En examinant les mécanismes primaires de la photosynthèse , on note que l'énergie lumineuse absorbée est dissipée sous forme d'énergie chimique. Cependant, il existe une fraction de l'énergie absorbée qui est dissipée sous forme de fluorescence ($\sim 1\%$) . Comme les deux processus photophysiques donnent une indication sur l'activité photosynthétique d'une part et d'autres part , les conditions de mesure des travaux déjà publiées sur des systèmes modèles ne reproduisaient pas celles des membranes , il nous a semblé de première importance de mettre au point un système de mesure optique permettant d'étudier les constituants photosynthétiques dans un système modèle qui se rapprochait de celui in vivo , soit celui des films Langmuir et des films Langmuir-Blodgett et cela avec une meilleure sensibilité . Afin d'atteindre la sensibilité désirée , il nous a semblé important d'orienter notre étude dans la conception et la mise au point d'un spectromètre inédit qui permettrait la mesure des propriétés optiques en terme de spectres d'absorption et de fluorescence . Nous verrons dans ce qui suit que nous avons atteint notre objectif dans le cadre du présent mémoire .

METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

2.1 Produits chimiques utilisés

Dans cette section on décrit les sources d'approvisionnement des produits utilisés tout au long du présent projet de maîtrise . La méthode de préparation des monocouches ainsi que la déposition des films Langmuir-Blodgett demandent qu'un certain nombre de paramètres soient parfaitement contrôlés . Parmi ces paramètres , nous pouvons citer la pureté des molécules étalées à la surface du bain et les produits servant à préparer la phase aqueuse . Il sera donc question dans cette section de montrer l'importance de la pureté des produits utilisés , les principales méthodes de purification de l'eau et le nettoyage des lamelles de quartz qui serviront de substrat.

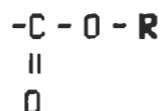
Chlorophylle a

La Chl a est extraite de feuilles d'épinard et purifiée dans les laboratoires du Centre de recherche en photobiophysique suivant deux méthodes complémentaires déjà décrites par Omata et Murata (1980) ainsi qu'Iriyama et Yoshiura (1979) . On maintient les cristaux de Chl a sous vide ou dans une atmosphère d'argon à une température de -20 °C afin d'éviter leur oxydation ou leur phéophytinisation . La vérification de leur pureté par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) précède leur utilisation . Les mélanges qui contiennent de la Chl a sont conservés à sec , sous atmosphère

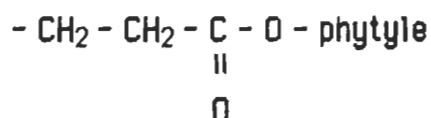
d'argon , dans un thermos contenant de l'azote liquide . Ces procédures sont nécessaires car la solution de la Chl *a* ne se conserve que deux ou trois heures. Au delà de cette période , il y a apparition de produits de dégradation très difficiles à séparer (Robert, 1967) .

Structure moléculaire de la Chl *a*

Avant d'aborder les propriétés optiques de la Chl *a* , il est important de connaître les caractéristiques structurales de cette molécule (figure 2.1). Elle comprend deux parties principales : la partie hydrophile , le macrocycle , et la partie hydrophobe , la chaîne aliphatique . Une fois cette molécule étalée à l'interface air-eau , le groupement polaire est retenu sur la surface du substrat par la formation de liaisons hydrogènes tandis que la partie hydrophobe occupe l'espace au-dessus de la phase aqueuse (Caillé et Argen , 1975) . Dans le macrocycle , on identifie les quatres anneaux pyrroliques , notés I,II,III,IV centrés sur un atome de magnésium , typiques de la famille des porphyrines . L'atome centrale du magnésium se situe au-dessus du plan du macrocycle . Ce dernier porterait d'ailleurs une charge fractionnelle positive équilibrée par une charge négative équivalente répartie sur les quatres atomes d'azote . Attachés à ces anneaux , on retrouve un groupement vinyle ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) , un groupement éthyle ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) et les groupements méthyles ($-\text{CH}_3$) . Un cinquième anneau, unique à la famille des chlorophylles , complète le macrocycle . Sur ce dernier anneau se trouve un groupement cétonique ($\text{C}=\text{O}$) et un groupement ester



où R représente le groupement $(-CH_3)$. La seconde partie principale de la chlorophylle *a*, la chaîne aliphatique,



se rattache au macrocycle par l'anneau IV. On reconnaît un autre groupement ester dans cette chaîne.

La molécule de chlorophylle *a* possède les propriétés de donneur et d'accepteur d'électron. Parmi l'ensemble des groupements identifiés sur la molécule, certains se définissent comme des groupements fonctionnels d'oxygène (donneurs d'électron). L'anneau V comprend un groupement cétonique ($C=O$) et un groupement ester et, la chaîne aliphatique inclut un autre groupement ester. Pour sa part, l'atome central de magnésium établit le rôle d'accepteur de la molécule de chlorophylle *a*. L'ensemble qui forme ce que l'on appelle parfois la tête de la molécule *a* environ 1.5 nm de côté et son épaisseur est de peu inférieure à 0.4 nm (Vernon et Seely, 1966). La partie hydrophobe qui porte le nom de phytol, souvent appelée queue de la molécule, correspond à la deuxième partie de la molécule. Le phytol qui a une longueur de 2 nm peut interagir avec des entités moléculaires qui lui ressemblent, par exemple les chaînes d'acide gras (Chauvet et Patterson, 1988).

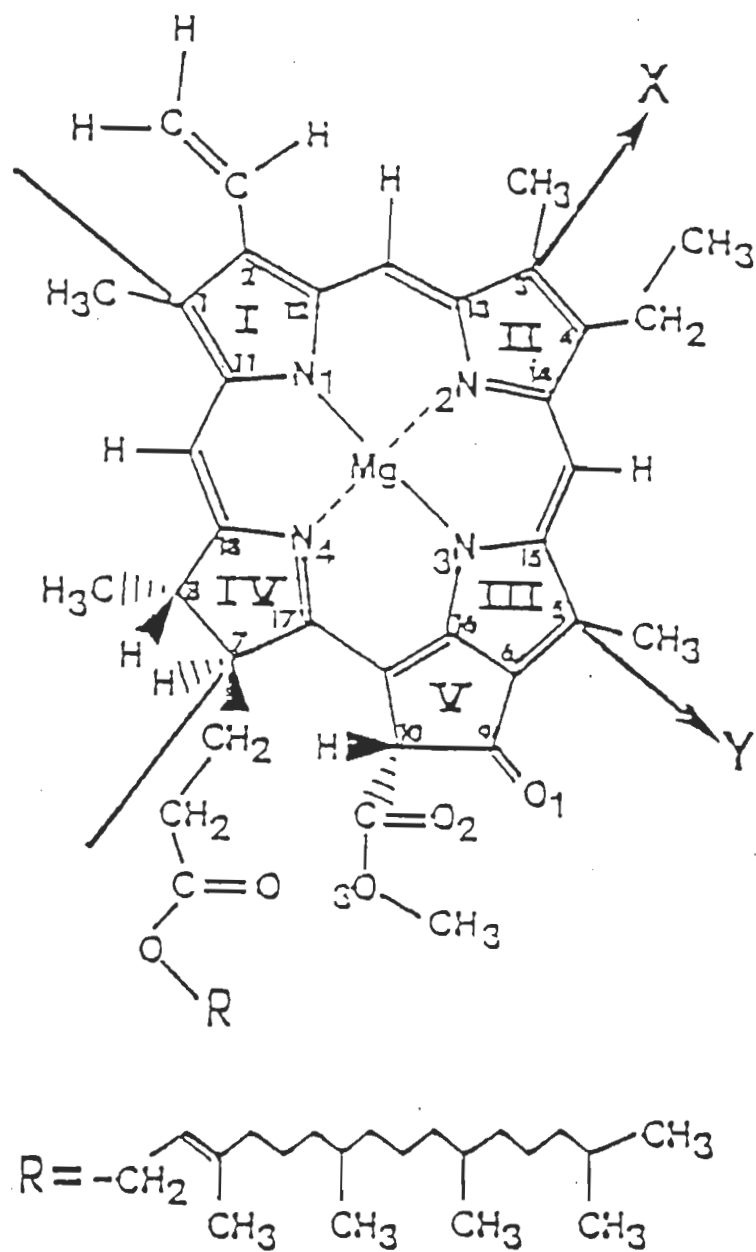


Figure. 2.1 : Structure de la molécule de Chl a (Breton et al., 1972)

Pureté de l'eau:

Les lipides ou mélanges de lipide sont déposés sur une sous-phase constituée d'un tampon phosphate décrit à la page 18 . L'eau utilisée doit correspondre à des critères de pureté absolue , et ce pour trois raisons :

- les impuretés peuvent devenir des noyaux de cristallisation ;
- elles peuvent éteindre la fluorescence ;
- elles réagissent aux composants du film mince .

L'eau filtrée provient d'un système "NANO pure" à trois cartouches (Sybron-Barnstead , Boston , MA) , qui élimine les matières organiques , minérales , ioniques dont le diamètre dépasse 0.2 μm . L'eau ainsi filtrée a une résistivité spécifique de l'ordre de 2 à 3 $\text{M}\Omega\text{-cm}$. Un autre système de filtration à haute pureté (Syborn-Barnstead , Boston ,MA) constitué de quatre cartouches disposées en série produit l'eau déminéralisée. Cette dernière à sa sortie du système possède une résistivité spécifique de 18 $\text{M}\Omega\text{-cm}$. L'eau déminéralisée contient toujours d'autres types d'impuretés , on l'introduit dans un système de distillation en quartz (Heraeus-Quarzschnelze, modèle BI 18 , Harrau , Allemagne) . L'eau distillée est recueillie dans une bouteille propre et utiliser pour les rinçages finaux lors du lavage de la verrerie et pour la préparation de diverses solutions tampon .

Port des gants

Tout ce qui entre en contact , de près ou de loin avec les lipides , les pigments ou l'eau utilisée pour le bain de monocouche est manipulé en mettant des gants . Ceci a pour but d'éviter de contaminer le bain ou les produits par les graisses naturelles présentes sur la peau . Il faut aussi éviter toute poussière et donc manipuler si possible en flacons bouchés .

Procédures de nettoyage des lamelles de quartz

La pureté de la surface des lames de quartz est d'une importance majeure .La moindre trace d'acide , de graisse ou de tout autre contaminant pourrait avoir des conséquences désastreuses sur nos résultats . On a utilisé la méthode de nettoyage de Munger et al. (1987) . Le nettoyage commence en frottant les lames avec un papier absorbant imbibé d'éthanol . Les lames sont ensuite placées sur un porte-lame de Téflon et rincées avec un jet d'éthanol . Le porte lame est immergé dans une solution de détergent . La solution est portée à ébullition pendant cinq minutes , par la suite les lames sont rincées à l'eau du robinet et à l'eau distillée . Après cette étape , elles sont trempées dans l'acide sulfochromique deux à trois heures , puis elles sont par la suite rincées abondamment à l'eau du robinet , puis à l'eau déminéralisée . Après une immersion de cinq minutes dans une solution de NaOH (10^{-2} M) , elles sont rincées à l'eau déminéralisée et à l'eau distillée . Un second trempage de quinze minutes dans le bain ultrasonique et dans l'eau distillée termine le

nettoyage . Enfin , on sèche les lames de quartz avec un jet d'azote juste avant la déposition des monocouches .

Nettoyage des lamelles après leur utilisation

On nettoie les lames de quartz après leur utilisation comme suit :

- dissoudre les pigments et les lipides avec un solvant tel que l'acétone ,
- frotter les lames avec un papier absorbant imbibé d'éthanol ,
- rincer à l'eau chaude ,
- frotter les lames avec un papier sec ,
- par la suite , on a recours à la procédure de nettoyage habituelle décrite à la section précédente pour utiliser à nouveau les lames .

2.2 Technique des monocouches

L'histoire des monocouches a commencé avec Irving Langmuir en 1917 lorsqu'il a transféré une monocouche de molécules d'une surface d'eau sur un substrat solide . Dès lors, de nombreuses molécules ont été étudiées sous forme de film déposé à l'interface air-eau . Une revue complète des propriétés des couches monomoléculaires a été écrite par Gaines (1966) . Lorsque des molécules amphiphiles sont étalées à l'interface air-eau , elles forment une monocouche insoluble . Il est possible de la caractériser en mesurant ses propriétés mécaniques (pression de surface) , électriques (potentiel de surface) , et optiques (ellipsometrie , absorption et fluorescence, etc.)(Andelman et al. 1987 ; Lamarche, 1988) . En fait , les monocouches de

constituants membranaires sont souvent employées comme systèmes modèles pour la reconstitution membranaire biologique , car elles se comportent d'une façon analogue à des demi-membranes .

2.2.1 Préparation d'une monocouche

Avant de remplir le triple bain d'eau , on procède au nettoyage des parties venant à son contact , comme la barrière mobile et le flotteur . Ces derniers sont soigneusement dégraissés avec du chloroforme , de l'éthanol , de l'éther et rincés plusieurs fois à l'eau distillée . La sous-phase utilisée pour nos monocouches est un tampon de phosphate de sodium dibasique 10^{-3} M (Na_2HPO_4) , (ACP Chem. Inc.; Montréal , QC) ajusté à un PH de 8.0 ± 0.2 à l'aide de phosphate de sodium monobasique ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) , (Sigma Chem., Co; St.Louis , MO) , saturé d'azote avec un barbottement de quelques minutes . Le tampon est versé dans le bain et on le laisse reposer durant une période d'attente de 3 à 4 minutes , afin de permettre aux molécules tensioactives et impuretés présentes dans la sous-phase de s'adsorber à la surface . On comprime ensuite la surface du bain avec une barrière mobile , puis on procède avec une pipette Pasteur reliée au vide d'un robinet au nettoyage de la surface . Il est nécessaire de nettoyer la partie arrière du flotteur afin que la tension superficielle soit identique de part et d'autre du flotteur . Comme le bain est recouvert d'un matériel hydrophobe , il est possible de le remplir de telle sorte qu'un ménisque excède le rebord supérieur . Après plusieurs nettoyages de la surface , on place la barrière à l'extrémité opposée du flotteur pour que la pression sur le flotteur soit nulle . On étale la substance étudiée à l'aide

d'une seringue micrométrique (Unimetrics Corp.; modèle TP 5100 , Analytical Instrm. SC . , Milton , ON) contenant 100 μ l de la solution de Chl *a* de concentration connue . Le pigment est dissout dans un solvant approprié , le benzène , qui est un solvant idéal pour sa déposition car il le solubilise bien , s'étale et s'évapore rapidement et est très peu miscible dans l'eau . L'aiguille de la seringue étant placée à environ 1-2 mm de la surface , on dépose quelques gouttes à différents points de la surface de l'eau . Une attente de 15 minutes est nécessaire pour permettre au solvant de s'évaporer . Les molécules sont étendues à la surface de l'eau . On comprime le film monomoléculaire à l'aide de la barrière mobile tel que schématisé à la figure 2.2 . Les molécules se rapprochent les unes des autres et s'orientent ; pendant ce processus , l'aire occupée par les molécules diminue . Elles ne peuvent pas quitter la surface de l'eau à cause du caractère hydrophilique de leur tête polaire et ne peuvent pas se dissoudre dans l'eau à cause de leur longue chaîne aliphatique . Ainsi , lorsque l'aire occupée par les molécules est minimale , ces dernières forment un film compact et stable à l'interface air-eau . Suite aux mesures des spectres d'absorption et de fluorescence , la monocouche est enlevée de la surface par aspiration au moyen d'une pipette Pasteur .

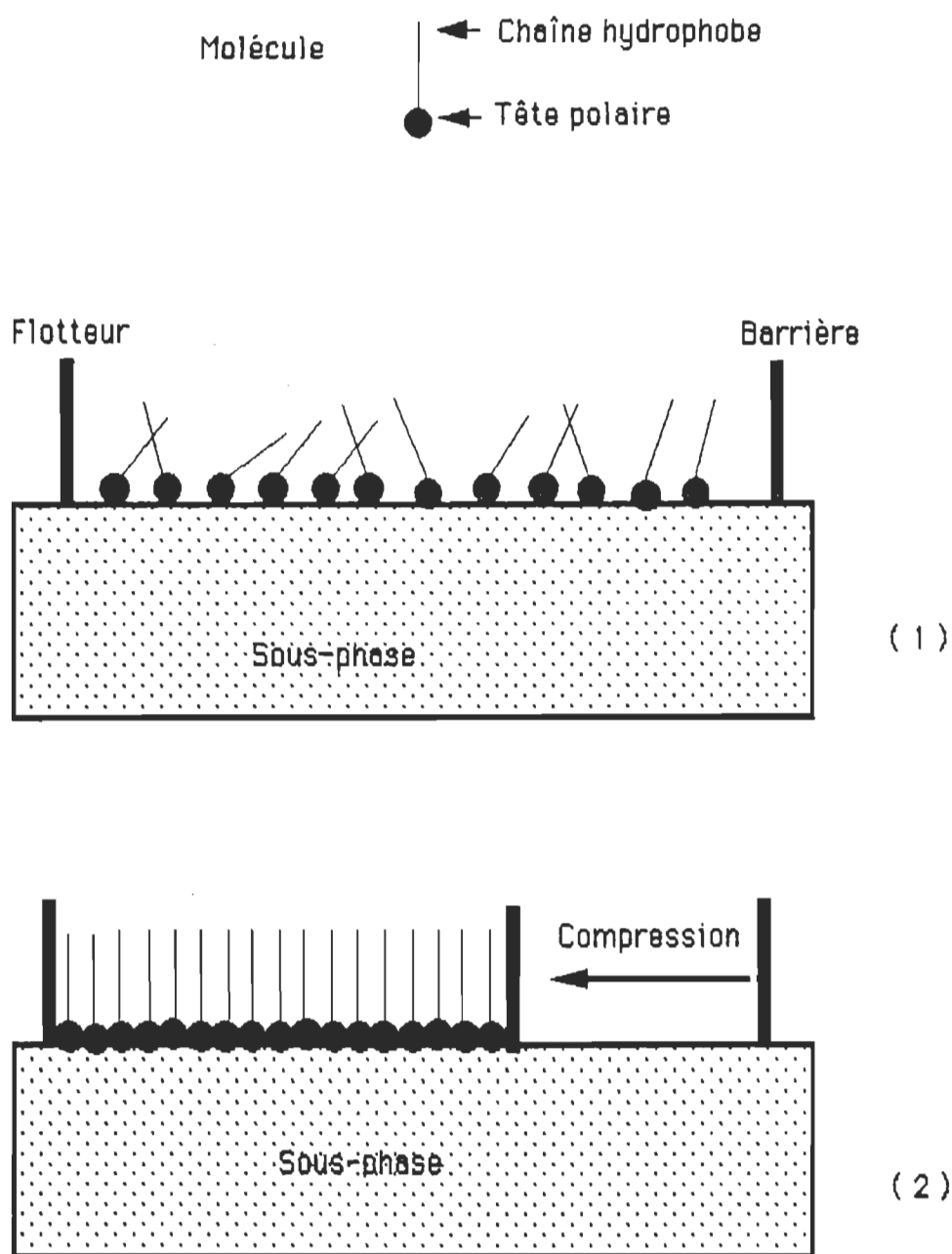


Figure. 2.2 : Représentation schématique de l'orientation des molécules en monocouches avant (1) et après (2) compression

2.2.2 Préparation des films de Langmuir-Blodgett

Les films Langmuir-Blodgett (L-B) sont des films ultraminces de molécules organiques déposées sous forme de couches monomoléculaires sur un substrat solide. Depuis leur découverte par Irving Langmuir , ils sont restés pendant de nombreuses années de simples curiosités de laboratoire . Les films L-B connaissent actuellement un essor rapide en raison de leur haut degré d'organisation et de la grande variété des molécules qui sont employées, ce qui leur ouvre de nombreux domaines d'applications tel que l'électronique moléculaire , l'optique linéaire et non linéaire , la microlithographie , les senseurs et biosenseurs , la biologie , la catalyse , etc . (Barraud , 1987 ; Batey et al. 1983 ; Chan et al. 1987 ; Hong et Rubner , 1988 ; Nishikata et al. 1988 ; Ogawa et al. 1987 ; Sugawara et al. 1989 ; Uekita et al. 1989) etc . La majorité de la littérature issue du groupe de recherche du professeur Leblanc concerne la technique de L-B et son utilisation dans des domaines très variés. Pour nos mesures optiques , les films monomoléculaires furent transférés sur des lames de quartz non fluorescentes . La première étape dans la construction d'un film monomoléculaire consiste en l'étalement d'un volume de 100 μ l de la solution, par exemple la Chl *a* , à la surface d'un tampon phosphate contenu dans le bain. Après que le solvant se soit évaporé , on comprime à l'aide de la barrière mobile les molécules jusqu'à une pression de surface de 20 mN m⁻¹ (Picard , 1989) pour former un film compact et stable à l'interface air-eau (voir pour plus de détails la préparation d'une monocouche à la section 2.2) . Pour minimiser les vibrations à la surface lors de la déposition , des pneumatiques supportent le bain de Langmuir . De plus lors de

la manipulation du film le système de ventilation de la chambre de travail est interrompu (tout en s'assurant de garder une température entre 18 et 20 °C). Afin d'éviter toute dégradation de la Chl *a* , toutes les manipulations se sont déroulées sous un éclairage vert . On suspend deux lames à un support , lui-même relié à un système hydraulique dont on retrouve les caractéristiques dans l'article de Munger et al. (1987) . Ce système assure une descente et une remontée régulière de la lame à une vitesse choisie et constante . Durant toute la phase de déposition , la barrière mobile se déplace continuellement vers le substrat pour maintenir toujours la même pression superficielle . A la première plongée , due à sa surface hydrophile , la lamelle de quartz ne retiendra pas les molécules de Chl *a* , mais à la remontée , elle rencontre les groupements polaires des molécules qui peuvent s'y fixer grâce aux interactions de ponts hydrogènes et il y a adhérence d'une monocouche sur chaque face de la lamelle Ainsi les deux faces étant hydrophobes , à chaque plongée et remontée ultérieure , il y a une monocouche qui s'ajoute , on peut ainsi déposer plusieurs dizaines de couches . Après plusieurs dépositions , on obtient un super réseau orienté suivant un axe . Suite au transfert des molécules de Chl *a* sur le quartz , on laisse la monocouche sécher quelques minutes , puis rapidement , on l'ajuste au porte lame . Cette mesure de sécurité vise à prévenir le danger de phéophytinisation. Enfin , on se dirige aux appareils pouvant enregistrer les propriétés optiques (absorption et fluorescence) , la description du système de fluorescence pour les films L-B est décrite en détail par Gallant (1990) . Le principe de la méthode de déposition est illustré à la figure (2.3) .

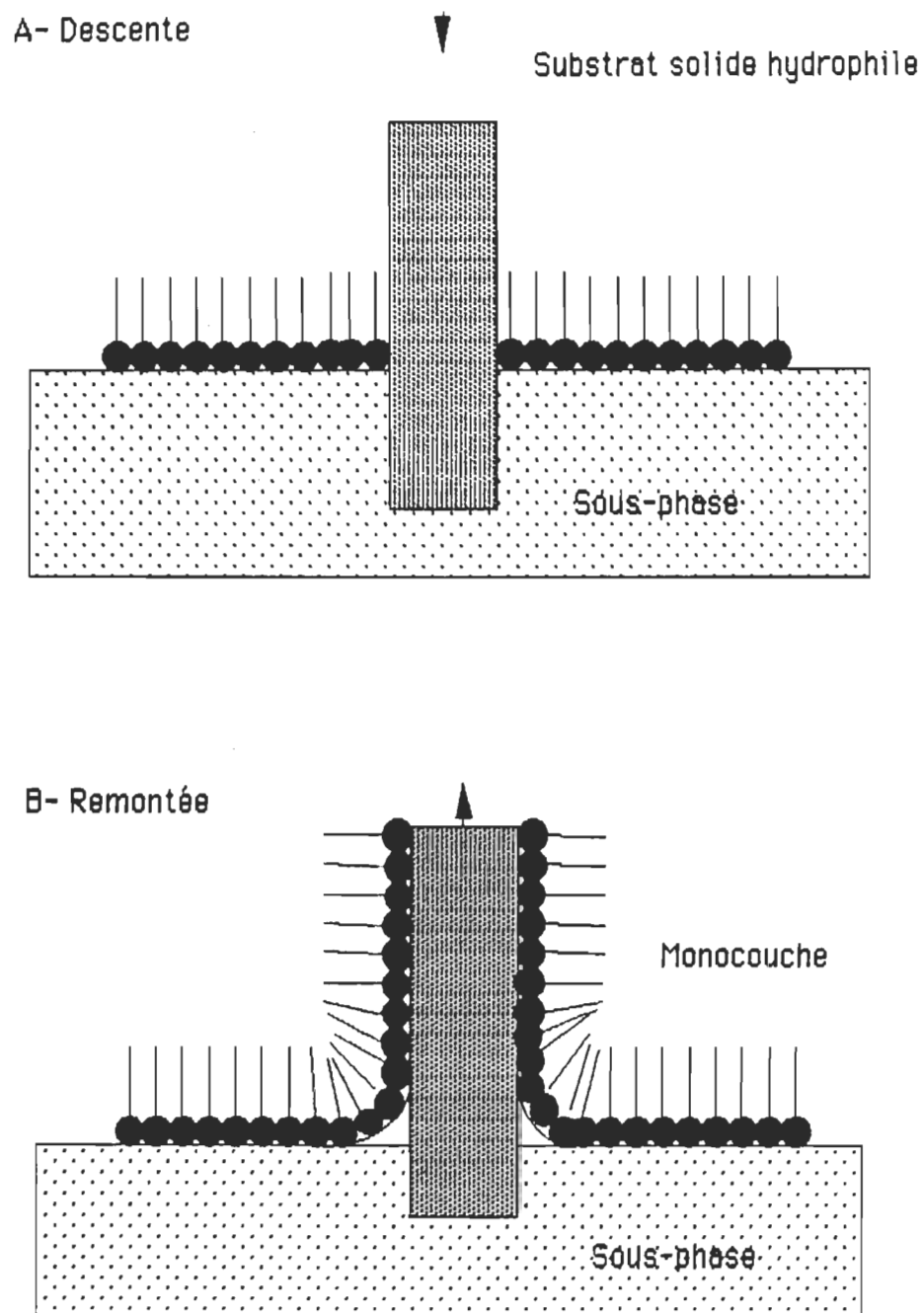


Figure. 2.3 : Déposition d'une monocouche sur un solide hydrophile

SYSTEME DE MESURE DES PROPRIETES OPTIQUES A L'INTERFACE AIR- EAU

3.1 Conception et mise au point du système

Le présent chapitre contient toute la documentation nécessaire sur l'expérimentation réalisée telle que , le bain , la barrière mobile , le flotteur , le balancier, le transducteur magnétique linéaire, l'étalonnage , la description du système de mesure et les caractéristiques du système .

3.1.1 Généralités

L'appareil utilisé a été adapté pour nos propres expériences et fabriqué dans nos ateliers . Une brève description est nécessaire pour comprendre le fonctionnement . Les principales composantes du triple bain sont illustrées aux figures 3.1 et 3.2 qui présentent respectivement le schéma général du bain et le schéma détaillé de la balance de torsion . En fait , la conception originale de cet appareil est de Langmuir (1917) , par la suite plusieurs auteurs tels que Guastalla (1939) , Anderson et Evett (1952) , Turnit et Lauer (1959) , Mann et Hansen (1960) , Vroman et al. (1968) , Fromherz (1975) ont apporté différentes modifications permettant à la fois de faciliter les méthodes de mesures et d'augmenter leurs précisions .

Bain : Le bain utilisé est constitué de plaques d'aluminium maintenues ensemble pour former ce qu'on appelle le triple bain (voir figure. 3.1) . Il mesure 64.0 ± 0.1 cm de long par 47.0 ± 0.1 cm de large et a une profondeur

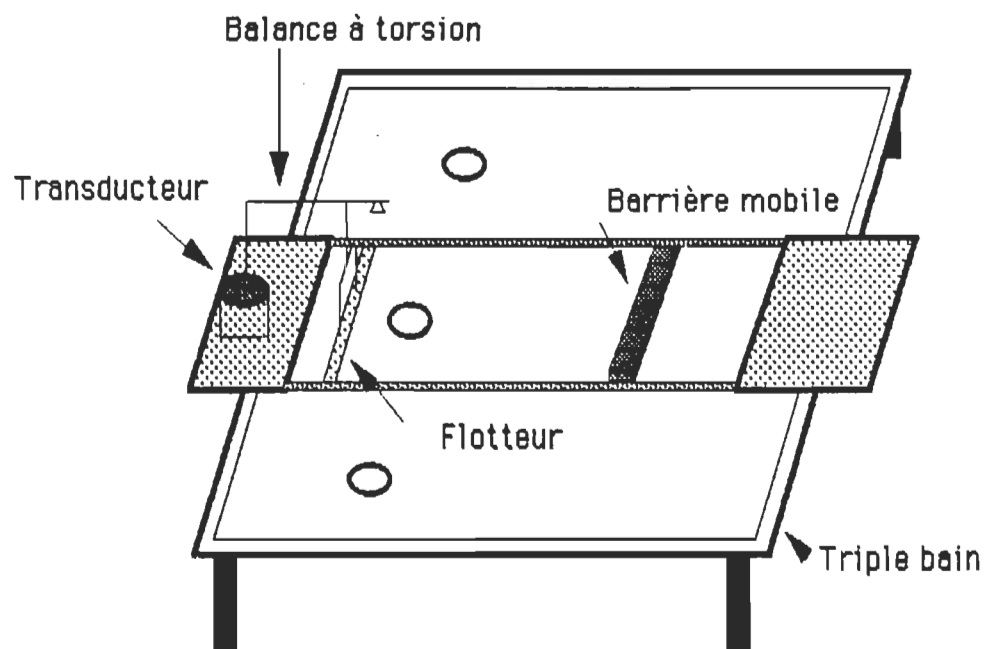


Figure. 3.1 : Schéma du triple bain

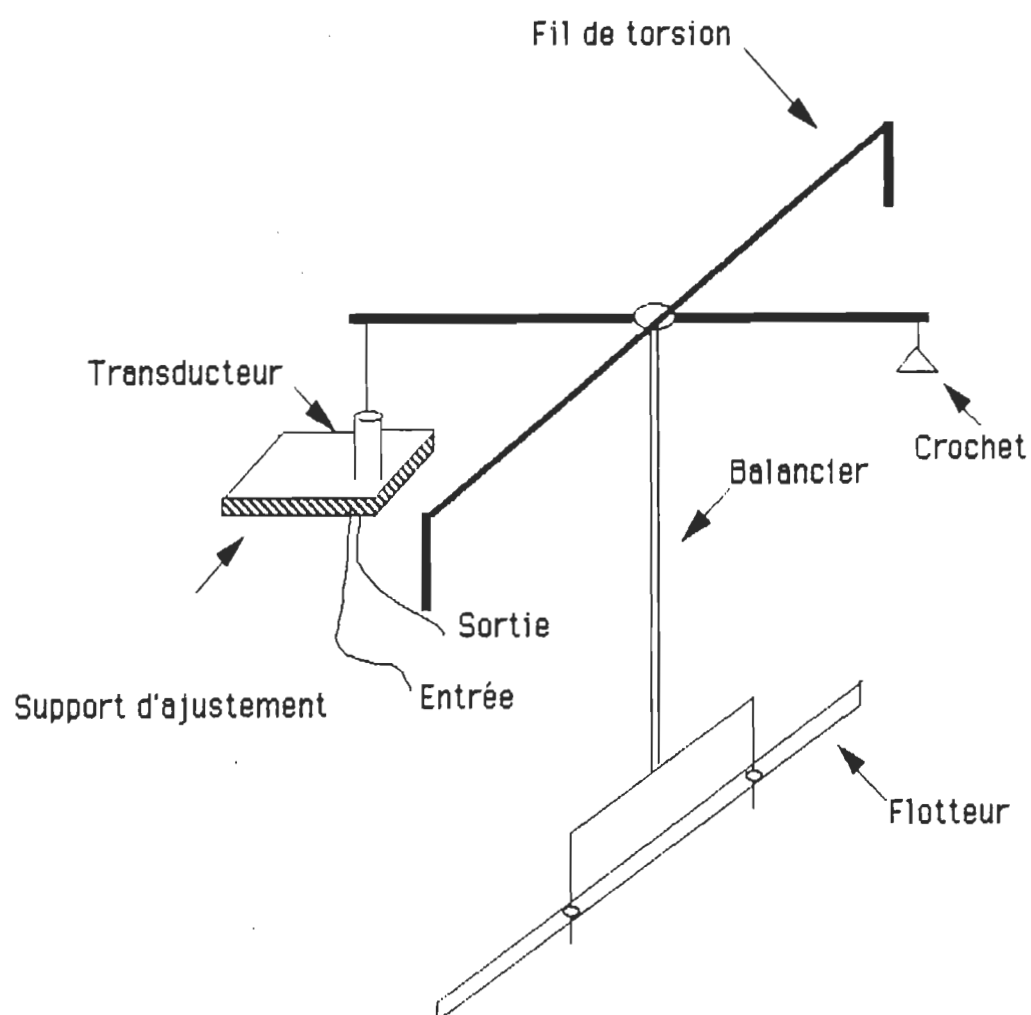


Figure. 3.2 : Schéma détaillé de la balance de Langmuir

de 1.0 ± 0.1 cm . Afin d'éviter le contact de l'eau avec l'aluminium qui peut produire un oxyde d'aluminium "nocif" pour le travail en monocouche , la surface interne du bain a été recouverte avec du Téflon par Canadian Coating Industries , Montréal . Ce dernier assume un bon contact entre la sous-phase , la barrière et le flotteur . On nettoie périodiquement le Téflon avec un papier absorbant imbibé d'éthanol pour éviter toute contamination de la sous-phase .

Barrière mobile : La barrière mobile permet de comprimer les molécules déposées à la surface de la sous-phase . Cette compression produit une augmentation de la pression exercée sur le flotteur . Elle est constituée d'une pièce de métal ($15.0 \pm 0.1 \times 4.0 \pm 0.1 \times 2.0 \pm 0.1$) cm dans laquelle est insérée une pièce de Téflon ($14.1 \pm 0.1 \times 1.0 \pm 0.1 \times 0.05 \pm 0.01$) cm qui vient en contact avec la sous phase et la monocouche . La barrière se déplace à l'intérieur d'un cadre de Téflon rigide qui permet de maintenir un contact constant et ainsi éviter les fuites de la monocouche . Le mouvement de la barrière a été actionné manuellement . La position de départ de la barrière mobile ne doit produire aucune pression de surface en présence de la monocouche .

Flotteur : À 10.0 ± 0.1 cm d'une des extrémités du bain se trouve un flotteur de Mylar (Dupont of Canada Ltd , Montréal) de dimensions ($12.0 \pm 0.1 \times 1.0 \pm 0.1 \times 0.075 \pm 0.005$) cm, qui est relié aux parois du bain par deux feuilles minces de Téflon de dimensions ($4.0 \pm 0.1 \times 0.8 \pm 0.1 \times 0.0075 \pm 0.005$) cm . Ces feuilles sont fixées à l'aide de la cire (notons que cette cire n'affecte nullement la Chl a) et sont placées en demi-cercles , l'un convexe ,

l'autre concave , aux extrémités du flotteur de façon à empêcher le matériel déposé à l'interface d'atteindre le compartiment propre à l'arrière du flotteur et de permettre ainsi un certain mouvement horizontal de ce dernier . Un déplacement du flotteur produit une torsion du fil de torsion dont l'angle de torsion est mesuré par un transducteur magnétique linéaire (à une pression de surface de 20 mN m^{-1} l'angle de torsion est de $7.7^\circ \pm 0.1^\circ$. Il possède deux trous (1 mm de diamètre) pouvant recevoir les dents de la fourchette terminant la partie verticale du balancier . La caractéristique importante du flotteur est qu'il soit hydrophobe et inerte.

Balancier : Il est constitué de tiges de métal soudées les unes aux autres. Il est fixé sur le fil de torsion au moyen d'une vis et son extrémité verticale est terminée par une fourchette qui s'introduit dans le flotteur . Le mouvement de ce flotteur est par conséquent communiqué à l'ensemble du balancier . Le bras horizontal porte un plateau sur lequel on dépose les poids servant à calibrer l'appareil de mesure .

Transducteur magnétique linéaire : Cet appareil fut conçu par Turnit et Lauer (1959) et Mann et Hansen (1960) . Après la mise au point du principe , différents groupes de chercheurs comme Frommer et Miller (1965) et Fromherz (1975) travaillant en monocouche amenèrent leurs propres transformations dans le but d'étudier plus profondément et avec plus de rapidité les substances organiques d'intérêt biologique . Lors du mouvements , ce déplacement est transmis à la barre de métal qui se déplace verticalement à l'intérieur du transducteur . Le schéma fonctionnel du transducteur apparaît

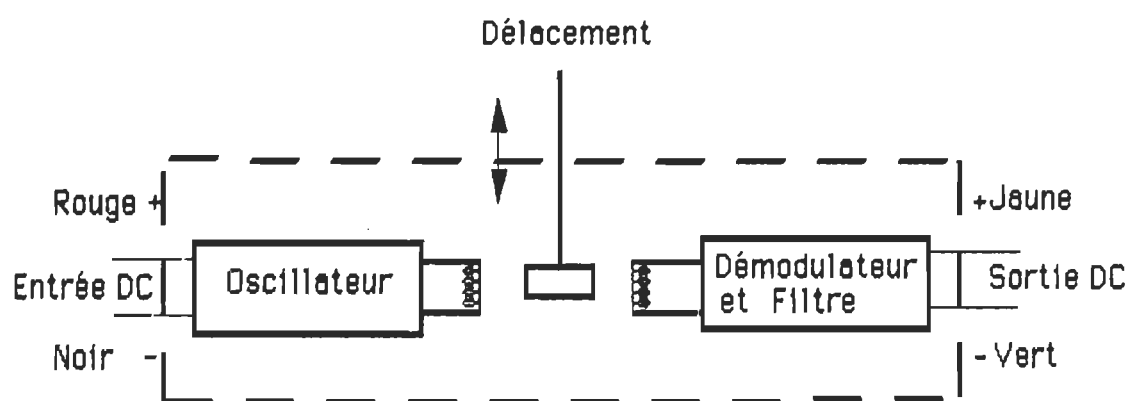
à la figure 3.3 . Le mouvement d'une barre métallique à l'intérieur du transducteur produit une différence de tension proportionnelle au déplacement de la barre (voir la figure 3.2). Cette tension aux bornes du transducteur est lue par un multimètre .

Afin d'éviter le contact avec la poussière , le bain est isolé dans une cage recouverte en papier d'aluminium , il est possible de déposer l'échantillon en ouvrant un couvercle placé au-dessus du bain .

Note sur la pression de surface

Tout liquide possède une tension superficielle (γ_0) qui le caractérise ; en particulier , l'eau a une tension superficielle de 72.88 mN m^{-1} à 20°C . Une fois que l'on a déposé les molécules amphiphiles insolubles à l'interface air-eau , la tension superficielle de l'eau est modifiée . Langmuir a développé un système qui permet de mesurer la différence de tension superficielle entre l'eau pure et celle sur laquelle est déposée la monocouche . Cette différence de tension superficielle , est à l'origine de la force mesurée par le système de Langmuir , et enregistrée grâce au déplacement d'un flotteur relié à un fil de torsion : $P = \gamma_0 - \gamma$

où P est pression de surface , γ_0 , la tension superficielle de l'eau , γ , la tension superficielle de l'eau sur laquelle est déposée le film monomoléculaire . Chacun de ces termes a les unités de mN m^{-1} (Gaines ,



Modèle : 24 DCDT-500 (Hewlett-Packard)

Voltage d'entrée : 24.0 ± 0.1 volts DC

Déplacement : 1.27 ± 0.01 cm de part et d'autre
de la position d'équilibre

Lecture maximum : 26.0 ± 0.1 volts

Figure. 3.3 : Transducteur magnétique linéaire

1966). En variant l'aire occupé par le film (au moyen d'une barrière mobile), on enregistrera les variations de la force exercée sur le flotteur, i.e. les variations de pression de surface en fonction de la concentration moléculaire (à l'interface).

Étalonnage

Après un nettoyage minutieux du bain avec du chloroforme et de l'éthanol, on le remplit d'eau distillée jusqu'à ce que la face inférieure de la barrière mobile adhère bien à la surface du liquide. En procédant par succion, on débarrasse la surface de l'eau de toutes particules contaminantes. Pour trouver la sensibilité du système du balancier, on l'étalonne avec des masses standards (pour une masse de 1 à 1000 mg la précision est de ± 0.0054 mg, CAHN Instrument Company, CA) que l'on dépose avec précaution sur un crochet (voir la figure. 3.2). Lorsque l'indicateur de la pression de surface indique zéro, on peut alors commencer l'étalonnage. À partir de masses attachées au crochet du balancier, on produit une déviation du fil de torsion, donc du point zéro sur l'écran. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 3.1. On trace un graphique donnant les masses en fonction de la déviation. En déterminant la pente de la droite à l'aide des moindres carrés, nous pouvons trouver la sensibilité du montage. Cette dernière est la constante de proportionnalité reliant la déviation (θ) à la pression de surface (P). ainsi

$$P = S . \theta$$

3.1

À l'aide du graphique donnant la courbe d'étalonnage , on peut écrire :

$$M = m . \theta \quad 3.2$$

où m est la pente de la droite obtenue et M la masse déposée sur le crochet lors de la calibration ; la masse M exerce le moment $M.g.L$ sur le fil qui dévie d'un angle θ , donc :

$$M . g . L = k . \theta \quad 3.3$$

où g est l'accélération gravitationnelle (=9.80629 N/kg , American Institute of Physics Handbook , 1972) , L représente la distance effective du fil de torsion au crochet du balancier (voir la figure. 3.2) , k est la constante de torsion du fil . Lors de la déposition des monocouches , c'est la pression superficielle de la monocouche sur le flotteur de Mylar qui produit le moment $P.L_1.L_2$, donc :

$$P . L_1 . L_2 = k . \theta \quad 3.4$$

où L_1 représente la longueur effective du flotteur de Mylar , L_2 représente la distance effective du fil de torsion au flotteur de Mylar . Pour une même déviation θ , nous avons :

$$P . L_1 . L_2 = M . g . L \quad 3.5$$

En introduisant M de l'équation (3.2) dans l'équation (3.5) on aura :

$$P = m \cdot \theta \frac{g \cdot L}{L_1 \cdot L_2} \quad 3.6$$

En remplaçant P de l'équation (3.1) dans l'équation (3.6) , on obtient l'expression donnant la sensibilité (S) de la balance :

$$S = m \frac{g \cdot L}{L_1 \cdot L_2} \quad 3.7$$

alors S présente des unités de milli Newton $m^{-1} V^{-1}$

Pour notre bain la sensibilité est de :

$$S = (67.90 \pm 0.09) \cdot 10^{-2} \text{ N m}^{-1} \text{ V}^{-1}$$

Le fait d'obtenir une relation linéaire lors de l'étalonnage ne signifie pas que l'ensemble du bain , comprenant la qualité de l'eau , le système de détection et autres particularités , répondent d'une façon idéale .

Masse (mg) ($\Delta M = \pm 0.0054$)	Déviaton (mV) ($\Delta V = \pm 1$)
0	10
20.0000	30
100.0000	90
200.0000	180
300.0000	260
400.0000	340
500.0000	430
600.0000	500
700.0000	590
800.0000	660
900.0000	750
1000.0000	830

Tableau. 3.1 : Calibration du système du balancier.

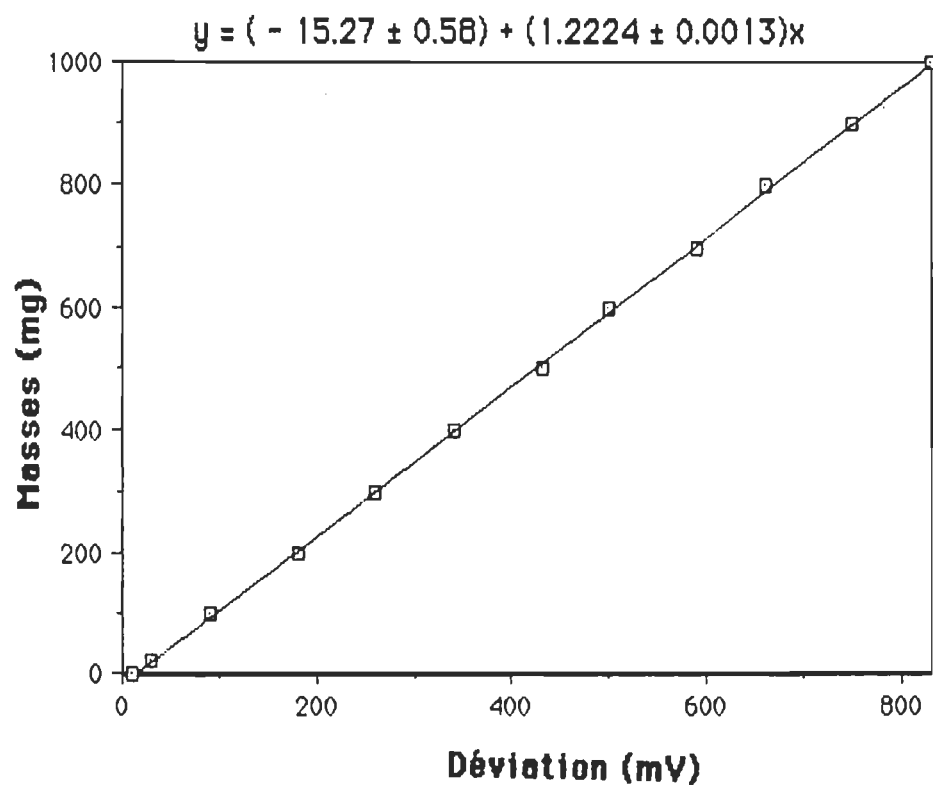


Figure. 3.4 Courbe de calibration du bain de Langmuir

3.1.2 Système de mesure de l'absorption

Le schéma optique du système de mesure de l'absorption est présenté à la figure 3.5 . La description de ce système est la suivante :

La radiation de la lumière d'excitation provient d'une lampe de 12 volts et de puissance 50 watts (BRL A1 /220 , Allemagne) . Elle est alimentée à l'aide d'une source de tension variable pouvant atteindre 20 volts et refroidie naturellement . Une lentille de verre (L1) d'une distance focale de 30 mm repose sur un cylindre en aluminium , elle sert à la mise au point sur la fente du monochromateur fixé au boîtier qui tient la lampe et la lentille . La distance entre la lampe et la fente du monochromateur est de 24 cm . Le monochromateur (modèle 1681 , Edison , NJ) est équipé de deux fentes , une à l'entrée et une autre à la sortie d'une largeur de 1.50 ± 0.05 mm et 0.80 ± 0.05 mm respectivement , et est contrôlé par ordinateur "Spex Datamate". L'ajustement des longueurs d'onde du monochromateur a été accompli à l'aide d'un laser He-Ne à la pression atmosphérique . Le faisceau incident du monochromateur se dirige sur une lame semi-réfléchissante inclinée à 45° par rapport à ce dernier . Une partie du rayon lumineux est réfléchi sur une photodiode P1 se trouvant à 3 cm à gauche de la lame . L'utilisation de la photodiode qui est reliée à un circuit de stabilisation (voir figure 3.6) nous a permis de contrôler l'intensité du faisceau lumineux tout au long du balayage . L'autre partie du faisceau lumineux passe ensuite à travers une lentille convergente (L2) d'une distance focale de 20 mm . La lentille L2 repose sur un support muni d'un ajusteur qui peut déplacer cette dernière verticalement .

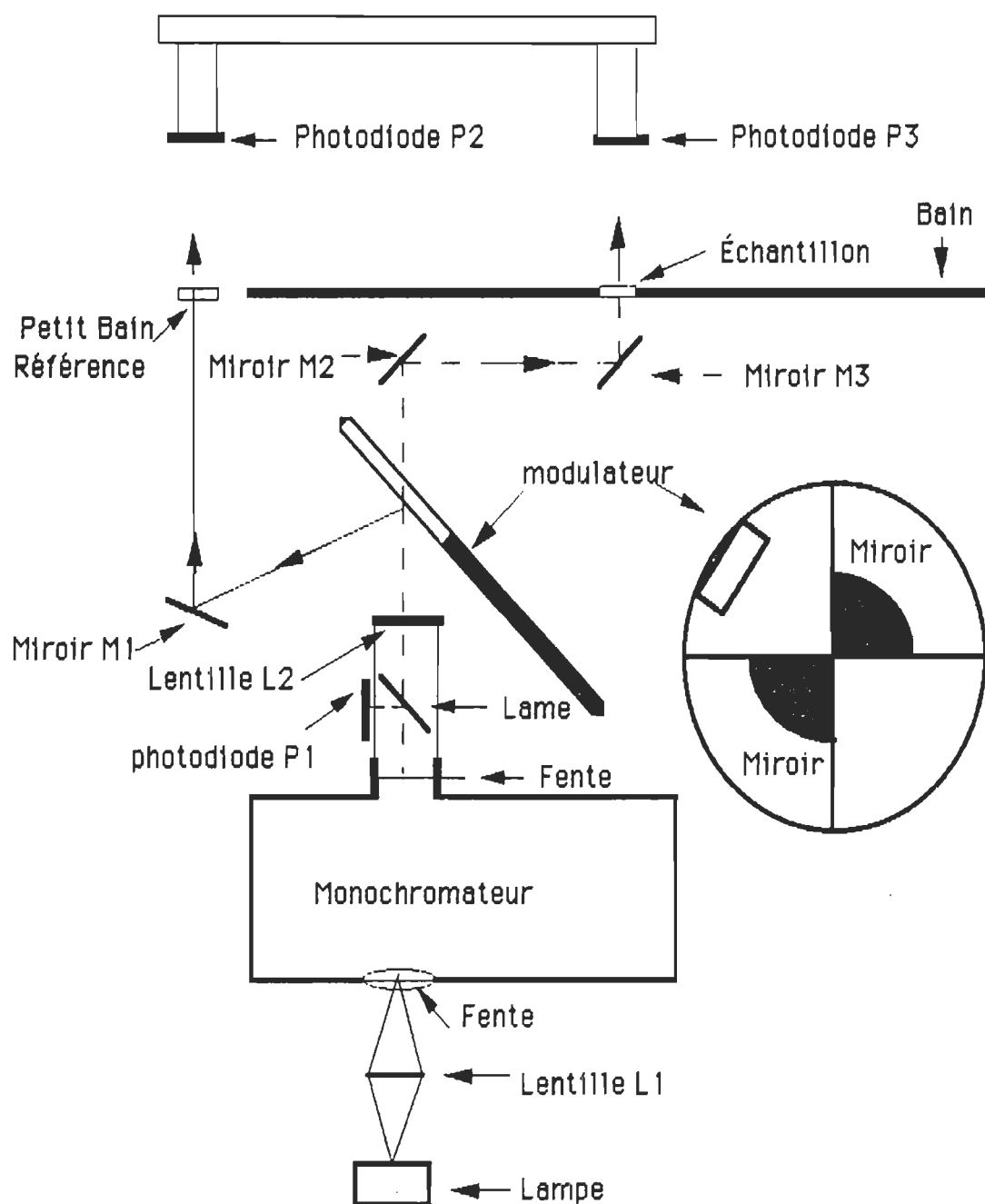


Figure. 3.5 : Schéma optique du système de mesure de l'absorption

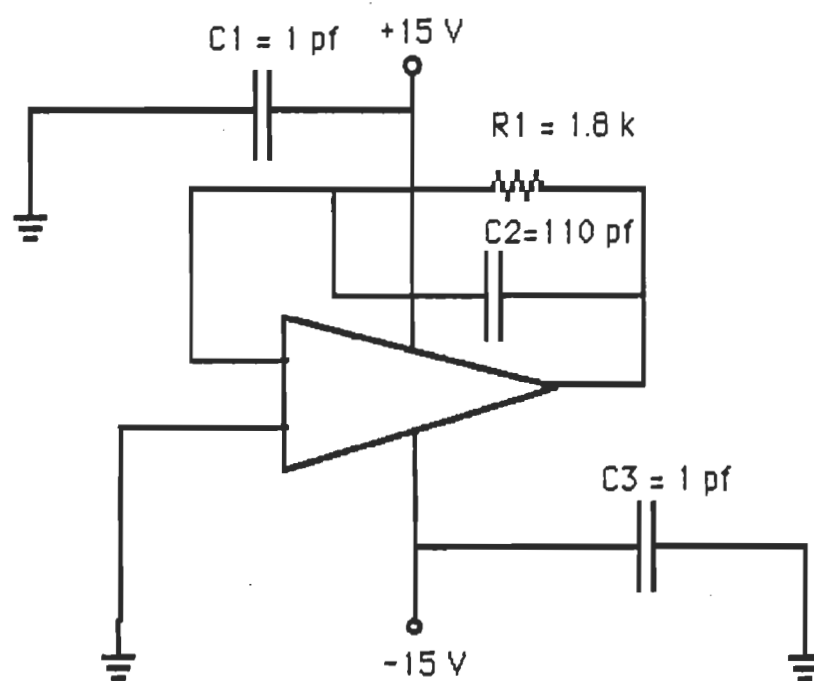


Figure.3.6 : Circuit de stabilisation de la photodiode

Afin de diviser et moduler en même temps notre faisceau lumineux , nous avons collé sur la plaque du modulateur deux morceaux de verre d'une certaine forme (voir figure 3.5) . Nous avons déposé par évaporation sous vide de l'aluminium sur les plaques de verre , pour avoir deux miroirs réfléchissants . Le modulateur se place à 45° par rapport au rayon lumineux . Lorsque le rayon lumineux frappe l'un des miroirs collés sur le modulateur , il est réfléchi sur le miroir M1 . Il traverse le petit bain utilisé pour la référence (disque creux contenant de l'eau tampon) et arrive sur la photodiode P2 . Le signal détecté nous servira de signal de référence . Lorsque le rayon lumineux passe à travers le modulateur , il est réfléchi par le miroir M2 sur le miroir M3 , traverse l'échantillon et se dirige finalement sur la photodiode P3 . Il nous fallait un détecteur très sensible dans la région de l'ultraviolet (400 nm) . Pour répondre à cette exigence , nous avons choisi une photodiode au silicone de type HUY-4000 de la compagnie Optikon combinée à un amplificateur opérationnel (Princeton Applied Research Modèle 128 , Princeton , NJ , domaine de fréquence 0.5 Hz à 100 kHz , sensibilité 1 mV à 250 mV) . On a fabriqué un convertisseur courant tension qui traduit en tension le courant produit par le détecteur , son facteur de conversion étant de 10^{-5} V/A . Le schéma de son circuit électrique est illustré sur la figure 3.7 . Pour éliminer le bruit et l'interférence , un filtre passe-bas est incorporé à l'intérieur de l'amplificateur opérationnel . Les données sont transmises à un ordinateur "Spex Fluorolog II" et peuvent être emmagasinées sur disque ou imprimées sur papier à l'aide d'une table traçante (Digital Plotter , modèle DM 112 ,Houston , TX) .

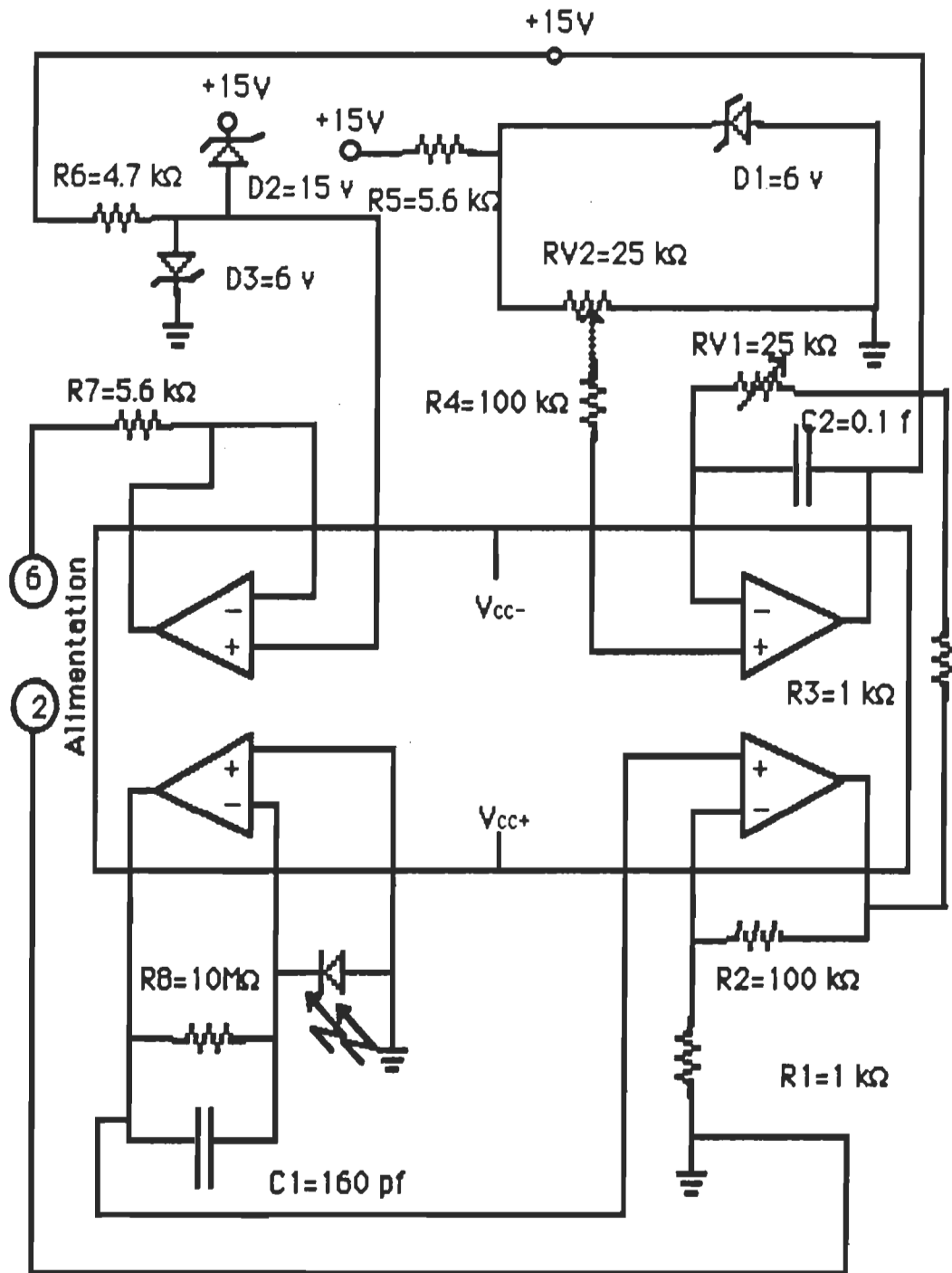


Figure.3.7 : Convertisseur courant-tension

Calcul de l'absorbance

Quand un rayon de radiation d'une longueur d'onde bien définie , atteint une substance , l'énergie associée à ce rayon peut varier selon les processus suivants : réflexion , réfraction , absorption et transmission . La situation la plus simple est celle pour laquelle le système obéit à la loi de Beer-Lambert (Milonni et Eberly , 1988) . Dans ce cas , I_e est l'intensité de la radiation transmise par une couche d'épaisseur b et de concentration molaire c . L'intensité du rayon transmis est alors exprimée sous la forme :

$$I_e = I_0 10^{-a b c} \quad 3.8$$

où I_0 est la lumière incidente sur l'échantillon , a , l'absorptivité molaire ($l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) indépendante de c , mais elle est une fonction de la longueur d'onde , de la température et du solvant . Dans notre système , on utilise deux faisceaux d'égale intensité . I_r est la radiation incidente de référence (celle du faisceau qui ne traverse pas l'échantillon) tandis que I_e est l'intensité de radiation transmise . L'équation (3.8) peut s'écrire sous la forme :

$$\log \left(\frac{I_r}{I_e} \right) = A \quad 3.9$$

avec

$$A = a \cdot b \cdot c$$

où A est l'absorbance de l'échantillon .

Les valeurs que l'on obtient avec l'appareil sont : $(I_r - I_e)$ et (I_r)

De l'équation 3.9 on a :

$$A = \log\left(\frac{I_r}{I_e}\right) = \log \frac{1}{1 - \left(\frac{I_r - I_e}{I_r}\right)} \quad 3.10$$

Procédure expérimentale pour calculer l'absorbance

Une fois le triple bain rempli d'eau , on mesure le spectre de référence (I_r) sur une échelle de 100 mV , puis celui de la différence $(I_r - I_e)$ en absence de la monocouche sur une échelle de 1 mV ($I_r - I_e$: représente la différence entre le faisceau de référence et celui qui traverse l'échantillon) . À l'aide des valeurs I_r et $(I_r - I_e)$ ainsi que de l'équation 3.9 , on détermine la ligne de base .

Après avoir déposé la monocouche à l'interface air-eau , on la comprime jusqu'à une pression de 20 mN m^{-1} , puis on procède à la mesure du spectre de différence $(I_r - I_e)$ sur une échelle de 1 mV . En utilisant les spectres de référence (I_r) , et de différence avec monocouche $(I_r - I_e)$ ainsi que l'équation 3.10 , on détermine un spectre d'absorption non corrigé . Pour corriger ce dernier , il faut le soustraire de la ligne de base . Il est à noter que le choix de la pression de surface de 20 mN m^{-1} est régi par l'orientation du plan de la porphyrine à l'interface air-eau qui se situe entre 55 et 60° . Cet angle correspond à celui que l'on retrouve pour la Chl *a* dans la membrane du thylacoïde .

3.1.3 Système de mesure de fluorescence

La figure 3.8 présente le schéma de l'appareil de mesure de fluorescence à l'interface air-eau. Nous avons construit un système de mesure de fluorescence similaire à celui qui existe déjà (le spectrofluorologue II) sauf que le nôtre est adapté à l'acquisition des données in situ. Il est placé verticalement par rapport à la surface du bain. Un tel système n'existait pas auparavant au Centre de recherche en photobiophysique. L'alignement des composantes optiques constitue une phase essentielle dans la mise en fonction de l'appareillage. Le faisceau de la lumière d'excitation provient d'une lampe Hg-Xe alimentée par une source de tension (LPS 200 Photon Technology International, London, Ontario) variable, pouvant atteindre 30 volts. Elle est refroidie par un débit d'eau froide. Une fente de 1.25 ± 0.05 mm de largeur détermine l'intensité de la lumière incidente. La radiation est ensuite dirigée vers un premier monochromateur (modèle 01-001, Edison, NJ) ayant une limite de résolution de 0.1 nm, contrôlé à la main qui sélectionne les longueurs d'onde d'excitation. L'étalonnage des longueurs d'onde des monochromateurs à l'excitation et à l'émission est accomplie à l'aide d'un laser He-Ne. Une seconde fente de même dimension que la première à la sortie du monochromateur permet la résolution du faisceau incident. Ce faisceau traverse un filtre (# 59820, Oriel, Stratford, CT) centré à 400 nm et ayant une bande passante de 120 nm. Ce filtre est utilisé pour couper toute lumière pouvant nuire à l'émission entre 600 nm et plus. L'excitation des molécules a été effectuée à une longueur d'onde de 440 nm. La lumière qui traverse le

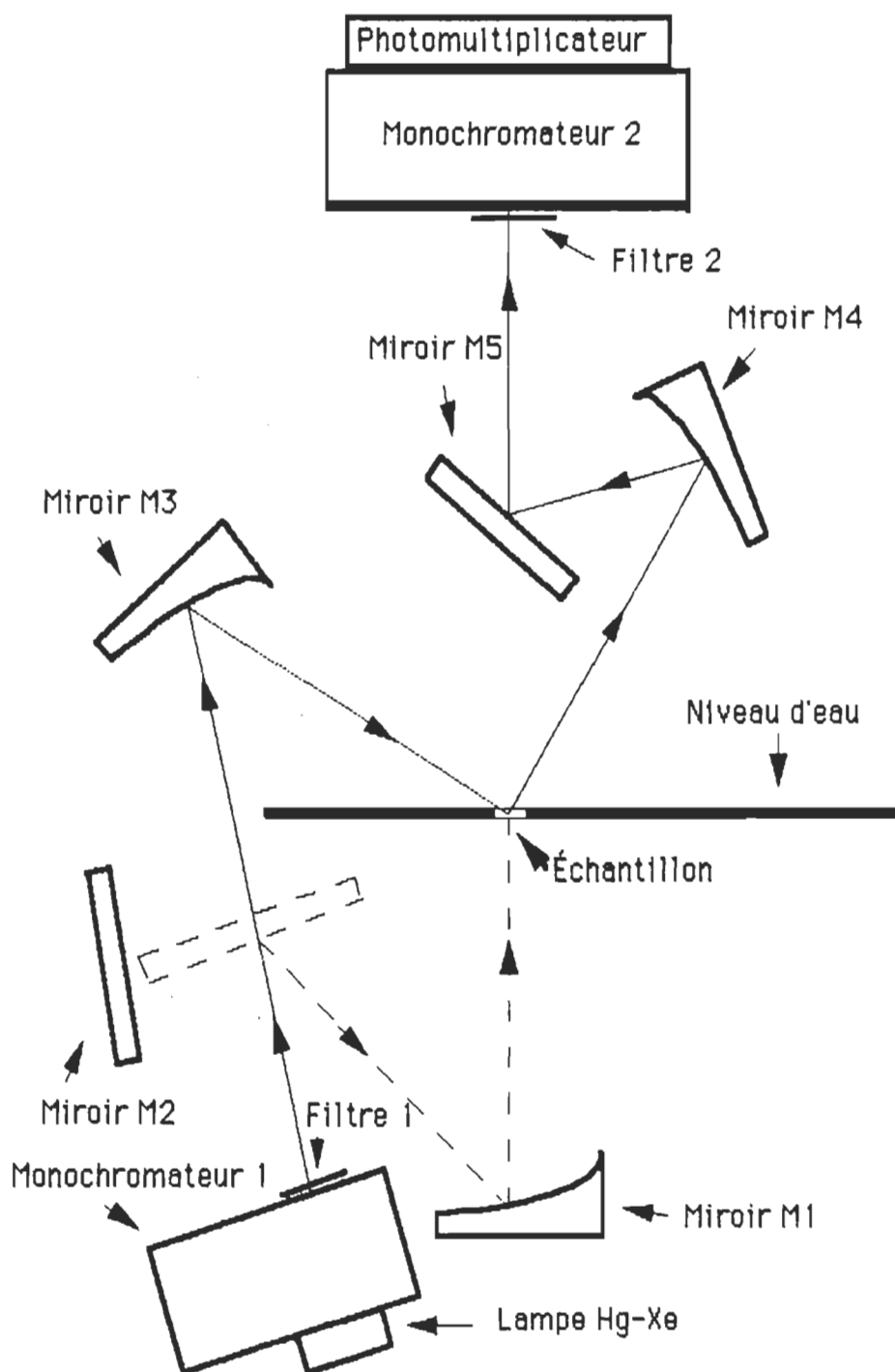


Figure. 3.8 : Schéma optique du système de fluorescence

filtre à la sortie du monochromateur 1 a deux parcours possibles qui mènent au détecteur. Le premier parcours : monochromateur 1 , miroir M2 ,miroir M1 , échantillon , miroir M4 , miroir M5 , monochromateur 2 , détecteur (voir figure. 3.8) . Le second parcours : monochromateur 1 , miroir M3 , échantillon , miroir M4 , miroir M5 , monochromateur 2 , détecteur (voir figure. 3.8) . Un filtre passe haut (03 FCG 089 , Melles Griot , Irvine , CA) laisse passer la lumière en haut de 570 nm . Une troisième fente de même dimension que les premières ajustent l'intensité de la fluorescence à l'entrée du monochromateur 2 (modèle 1681 , Edison , NJ) . Il est contrôlé par un ordinateur "Spex Datamate". Une dernière fente à la sortie de ce dernier , permet d'atteindre la résolution du faisceau fluorescent sur le photomultiplicateur contenu dans un tube où existe un vide poussé . Il comprend une surface sensible à la lumière , appelée photocathode qui transforme le flux de photons en un flux d'électrons , qui est par la suite amplifié en un courant électrique grâce à une série de dynodes . Ce courant est finalement capté sur une anode à l'intérieur du phototube . Un haut voltage résulte en un nombre accru d'électrons éjectés de chaque dynode et donc d'une amplification supérieure . La photocathode est refroidie par effet Peltier (Pacific Photometric Instruments , modèle 3457 , Emeryville , CA) jusqu'à - 20 °C ,dans le but d'en augmenter la sensibilité de même que le rapport signal / bruit . L'alimentation en courant est assurée par une source indépendante (Pacific Photometric Instruments , modèle 33 , Emeryville , CA) . Ainsi , les spectres de fluorescence peuvent être enregistrés par un ordinateur et emmagasinés sur disque . L'ordinateur est relié à une table traçante pour l'impression des spectres . Les mesures sont prises à intervalles de deux

nanomètres pendant deux secondes . Quant à l'émission , elle est balayée dans le domaine spectral compris entre 600 et 800 nm . L'appareil utilisé pour obtenir les spectres d'émission de fluorescence est le "Spex Fluorolog II" simple faisceau , équipé d'un accessoire "Dalanale D11" (système d'acquisition des données) .

3.2 Caractéristique du système

3.2.1 Spécifications du système de mesure d'absorption

Dans cette partie on identifie les performances du système de mesure . Le tableau 3.2 résume les caractéristiques du système de mesure d'absorption . Une fois que le système est stabilisé , c'est-à-dire après au moins une heure de fonctionnement , on mesure les spectres d'absorption . L'intervalle du spectre balayé se situe entre 400 et 800 nm . Le temps de balayage d'un spectre est de 4.50 minutes avec un temps d'intégration de l'amplificateur synchrone de 0.1 seconde et une constante de temps de 0.5 seconde . La figure 3.9 nous montre un spectre de référence avec un laser He-Ne comme source d'excitation , pris à chaque 0.1 nm avec un temps d'intégration de 0.1 seconde . La figure montre une largeur à mi-hauteur de la bande spectrale de 2.6 ± 0.1 nm et une précision sur la longueur d'onde de ± 0.5 nm . La stabilité sur l'absorbance à 500 nm , après une heure est de 1×10^{-4} u.a. (c'est-à-dire , si on mesure une absorbance pour une longueur d'onde donnée à $t_0 = 0$ et après une heure on mesure l'absorbance à la même longueur d'onde , on note que notre valeur a changé) . La figure 3.10 présente une

mesure d'absorbance en fonction du temps , c'est-à-dire , on fixe la longueur d'onde à 500 nm et on mesure l'absorbance à chaque seconde pour une période de 50 secondes . Si on prend la valeur crête à crête , c'est-à-dire le maximum moins le minimum , on trouve une valeur rms inférieure à 0.00004 ce qui nous donne un bruit de 1×10^{-5} u.a. et une reproductibilité de ± 0.2 nm . Les monochromateurs utilisées pour l'étude de l'absorption et de l'émission de fluorescence sont gérés par le même ordinateur qui contrôle l'acquisition des données . Ces deux monochromateurs ont une bonne pureté spectrale et une dispersion de 3.7 nm/mm font parti du fluorimètre "Fluorologue 2" .

Constante de temps	0.1 s
Temps d'intégration	0.5 s / lecture
Intervalle des longueurs d'onde	350-800 nm
Bruit	1×10^{-5} u.a. rms (à 500 nm)
Précision sur la longueur d'onde	± 0.5 nm
Largeur de la bande spectrale	2.6 ± 0.1 nm
Stabilité	Après une heure , la stabilité sur l'absorbance à 500 nm est de 1×10^{-4} u.a. / heure
Reproductibilité	± 0.2 nm

Tableau. 3.2 : Spécifications du système de mesure d'absorption

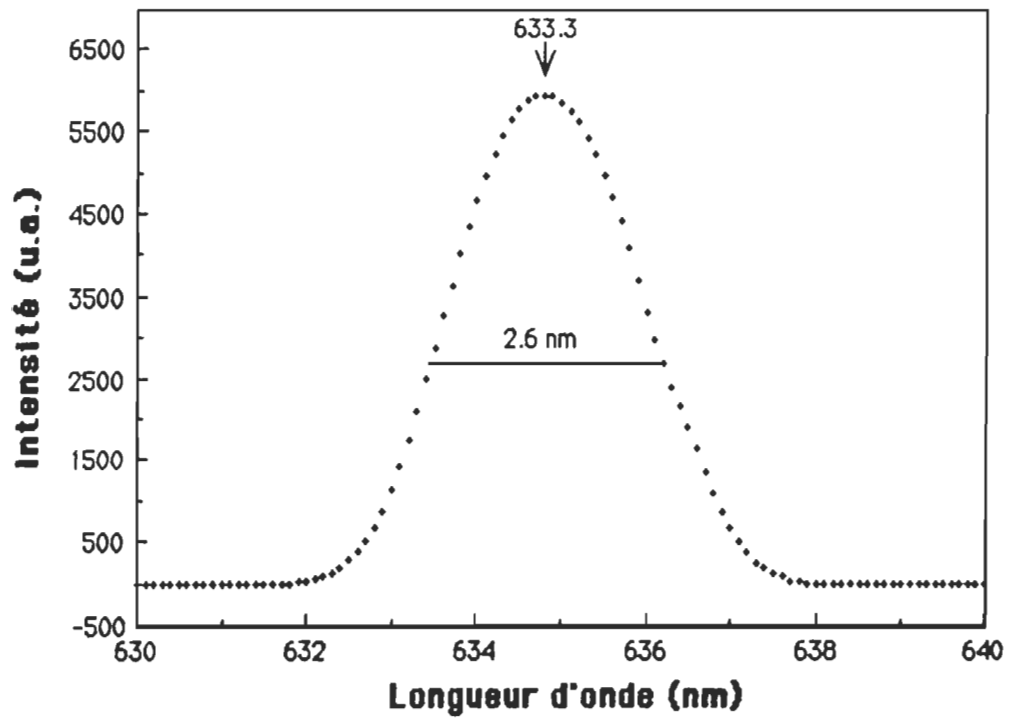


Figure. 3.9 : Spectre de référence à l'aide d'un laser He-Ne
comme source de lumière

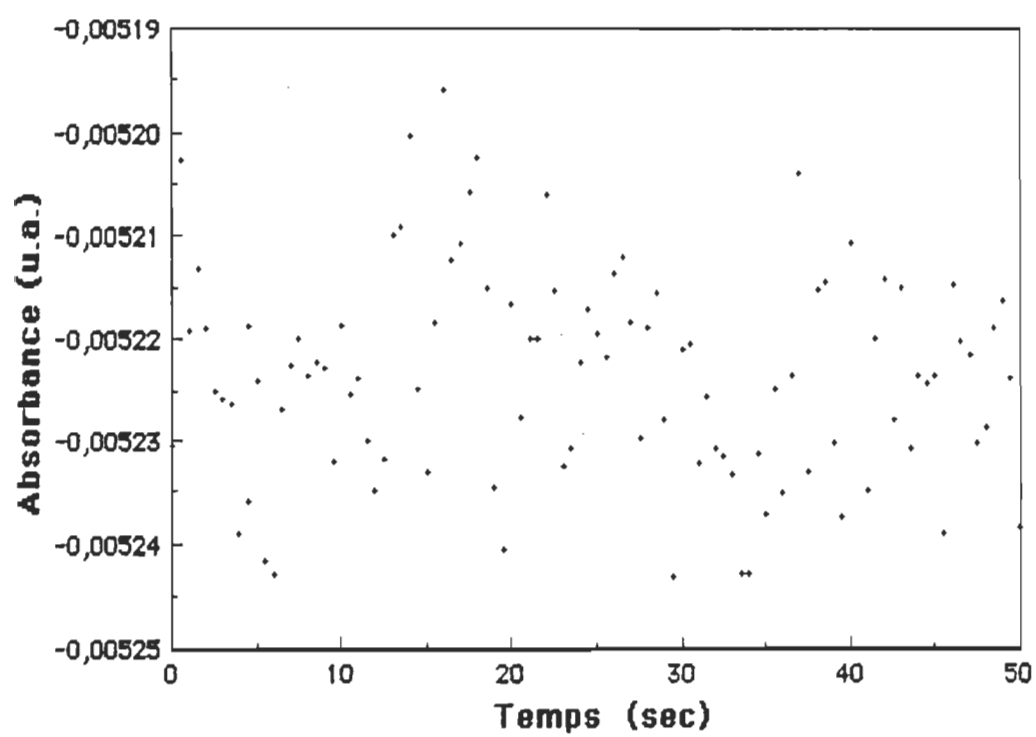


Figure. 3.10 : L'absorbance en fonction du temps pour une longueur d'onde fixe de 500 nm

3.2.2 Spécifications du système de mesure de fluorescence

Le tableau 3.3 résume les spécifications du système de mesure de fluorescence. Après une heure de fonctionnement, le système est stable et nous sommes en mesure de prendre un spectre de fluorescence pour un intervalle de longueurs d'onde variant de 600 à 800 nm, avec un temps de balayage de 3 minutes et une constante de temps de 1 seconde par nanomètre. La figure 3.11 montre le spectre de fluorescence à l'interface air-eau sans monocouche afin de vérifier le signal Raman qui est de 0.94×10^4 compte par seconde. Les fentes utilisées à l'entrée et à la sortie des monochromateurs ont une largeur de 1.25 ± 0.05 mm, et la lampe utilisée est du type Hg-Xe d'une puissance de 200 watts. Le signal sur bruit est de 31 dans la région des longueurs d'onde de 620 à 660 nm pour une monocouche de Chl *a* à l'interface air-eau. Le monochromateur choisi forme un ensemble complet avec la lampe d'excitation qui permet d'obtenir une intensité suffisante sur l'échantillon avec une dispersion de 4 nm/mm. Le détecteur à l'émission est un photomultiplicateur du type EMI-9558 QB refroidi thermoélectriquement. L'étude de la chlorophylle par spectrofluorimétrie est restreinte à la région uv-visible. En effet, le détecteur EMI-9558 QB n'est pas idéal pour les études de fluorescence des chlorophylles. Sa région d'utilisation est dans l'uv et le visible (300 nm - 700 nm), on se trouve à la limite du spectre de réponse du détecteur.

Intervalle des longueurs d'onde	250-850 nm
Lampe de Hg-Xe	200 W
Signal sur bruit	0.31×10^2
Précision sur la longueur d'onde	± 0.5 nm
Signal Raman à l'interface air-eau (compte par seconde)	0.94×10^4
Fentes à l'entrée et à la sortie	fentes fixes : 1.25 ± 0.05 mm
Détecteur à l'émission	EMI 9558-QB chambre refroidie thermoélectriquement

Tableau. 3.3 : Spécifications du système de mesure de fluorescence

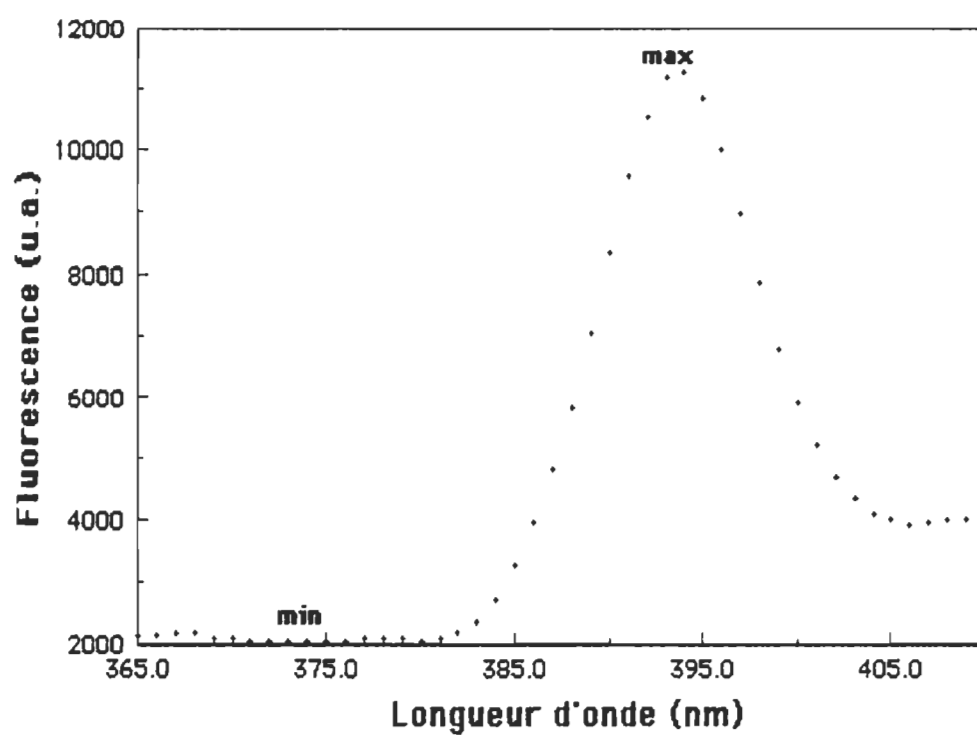


Figure 3.11 : Spectre de fluorescence à l'interface air-eau sans monocouche pour vérifier le signal Raman

RESULTATS ET DISCUSSION

En 1961, Duysens a établi que l'activité photosynthétique en présence d'une lumière de longueur d'onde élevée, attribuée au photosystème I, est associée à la Chl *a* et n'est pas accompagnée d'une libération d'oxygène (Duysens et al. 1961). Le PS II, qui est activé par des longueurs d'onde plus courtes, est nécessaire à la libération d'oxygène. La Chl *a* absorbe principalement la lumière dans la région bleue entre 420 et 440 nm et dans la région rouge entre 660 et 680 nm du spectre visible. La chlorophylle est un pigment sensible à la lumière, si elle est trop intensément irradiée, il y a photodégradation. C'est pourquoi il faut prendre soin de ne pas laisser la chlorophylle sous irradiation en dehors du temps de lecture.

Cette section résume les résultats de nos mesures expérimentales. On vérifie de ce fait l'exactitude des appareils impliqués dans les mesures optiques et l'état de pureté de nos produits. La première partie présente les mesures réalisées en absorption pour une monocouche de Chl *a* déposée à l'interface air-eau et sur substrat solide (lame de quartz) ainsi que le mélange Chl *a*-Pc pour une concentration de 1:10. Ensuite, on présente les résultats obtenus en fluorescence pour une monocouche déposée à la surface de l'eau et pour les films L-B, ainsi que pour le mélange Chl *a*-Pc pour une concentration de 1:10. Les diverses conditions expérimentales entourant l'utilisation du système, pour l'étude des monocouches à l'interface air-eau ainsi que la déposition des films monomoléculaires sur support solide, ont été présentées antérieurement (voir les chapitres 2 et 3). Les monocouches

de Chl *a* et de mélanges ont été déposées sur des lamelles de quartz hydrophiles . Ces dernières furent neutralisées avec une solution de NaOH (0.01 M) pour éviter la dégradation possible de la Chl *a* en phéophytine au contact des lamelles acides . Les monocouches de Chl *a* et de mélanges ont été déposées à une pression de surface de 20 mN m^{-1} . Toutes les expériences ont été menées en prenant soin de conserver les mêmes conditions expérimentales (température ambiante , température de la sous-phase , pourcentage d'humidité , vitesse de déposition) afin de s'assurer d'une reproductibilité dans les résultats expérimentaux .

4.1 Interprétation des spectres d'absorption

La chlorophylle *a* en film mince constitue un système modèle qui a fait l'objet de quelques publications (voir tableau 4.1) . Le spectre d'absorption de ce pigment a été mesuré par divers auteurs ce qui permet de comparer nos résultats expérimentaux avec ceux de la littérature .

4.1.1 Cas de la Chl *a* pure (À l'interface air-eau et en films L-B)

Les spectres d'absorption de la Chl *a* déposée à l'interface air-eau et en films L-B sont présentés aux figures 4.1 et 4.2 . On remarque qu'en plus des bandes principales pour les régions bleu et rouge du spectre visible , quelques épaulements sont présents dont les amplitudes varient selon l'échantillon étudié . Leurs positions sont sensiblement les mêmes d'un spectre à l'autre . On observe deux maxima situés à $440.0 \pm 0.5 \text{ nm}$ et $681.0 \pm 0.5 \text{ nm}$ pour les

monocouches déposées à la surface de l'eau . Dans le cas des films L-B (une couche de chaque côté de la lame) , les maxima sont situés à 440.0 ± 0.5 nm et 680.0 ± 0.5 nm . Si nous comparons nos résultats à ceux de références (voir tableau 4.1) , on note un excellent accord . Le maximum d'absorption dans le rouge rapporté pour une monocouche condensée est de 680 nm (Bellamy et al. 1963 ; De Costa et al. 1972) . Plus récemment , Heithier et al. (1983) ont montré que la position de ce maximum est faiblement influencée par l'état de compression du film ; en comprimant la monocouche de 3 à 21 mN m⁻¹ , le maximum d'absorption dans le rouge passe de 676 nm à 678 nm . La superposition des couches de chlorophylle a ne modifie pas sensiblement le spectre d'absorption .

Système	Bande de Soret nm	Bande rouge nm	Références
air-eau	440.0 ± 0.5	681.0 ± 0.5	ce travail
air-quartz	440.0 ± 0.5	680.0 ± 0.5	ce travail
air-eau	440	680	Bellamy et al. (1963)
air-eau	439	680	Heithier et al. (1983)
air-quartz	440	680	de Costa et al. (1972)
air-quartz	440 ± 2	680 ± 2	Désormeaux et Leblanc (1985)
N ₂ -quartz	440 ± 2	680 ± 2	Lamarche et al. (1989)

Tableau. 4.1 : Position des maximums d'absorption de la Chl *a*

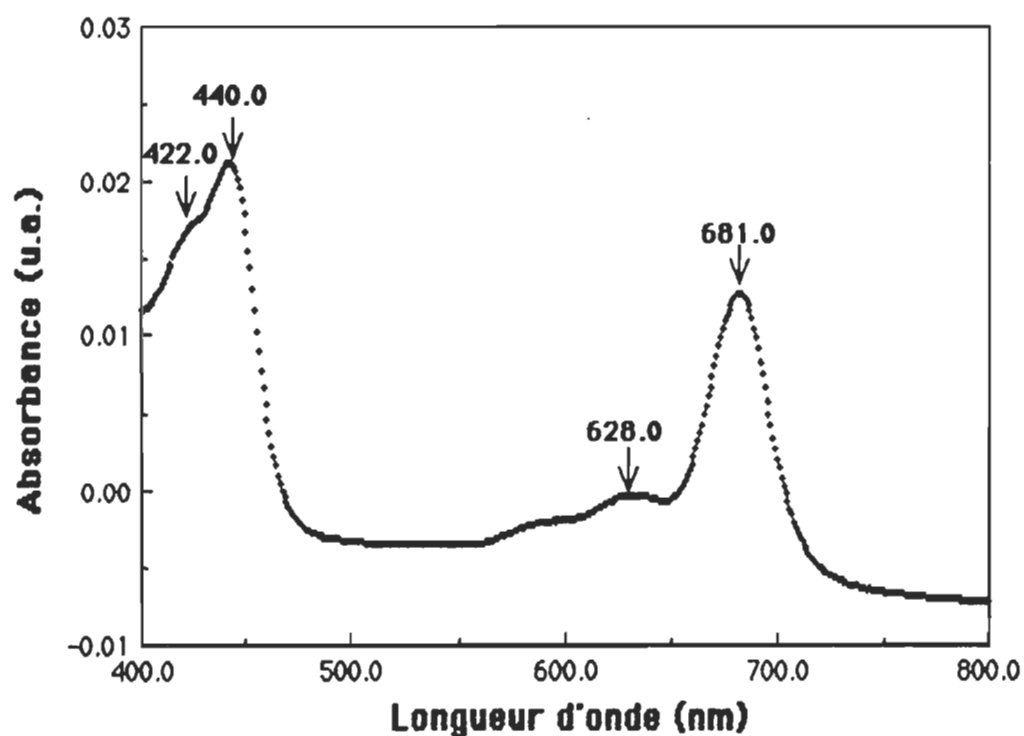


Figure. 4.1 : Spectre d'absorption d'une monocouche de Chl a à l'interface air-eau

(température ambiante $T=20\pm1$ °C, la sous-phase est un tampon phosphate avec un PH 8.0 ± 0.1 , 40% d'humidité, la pression est de 20 mN m^{-1})

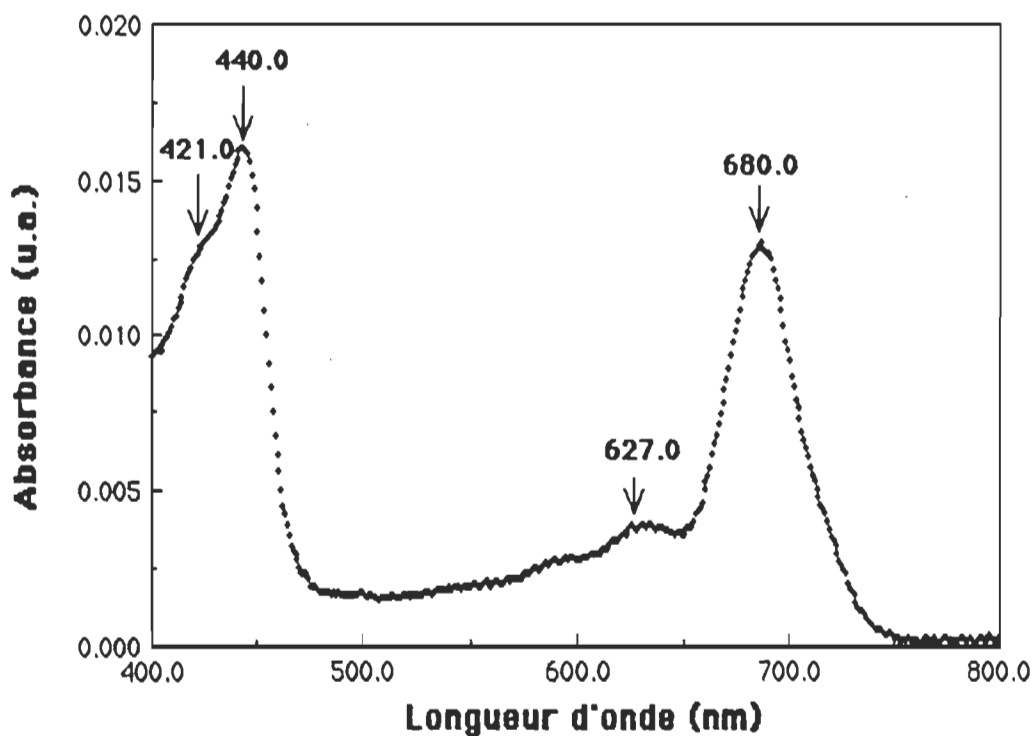


Figure. 4.2 : Spectre d'absorption de la Chl *a* pour un film L-B

(une monocouche de chaque côté de la lame ,
température ambiante, la sous-phase est un tampon
phosphate avec un PH 8.0 ± 0.1 , 40% d'humidité, la
pression est de 20 mN m^{-1} , vitesse de déposition
est de 1 cm mn^{-1})

4.1.2 Cas de dilution de la Chl a par la Pc d'oeuf (1:10)

Les mélanges binaires de Chl a avec des lipides en film monomoléculaire visent à simuler sa situation "in vivo". On s'approche alors de la réalité des membranes du thylacoïde.

Les spectroscopies d'absorption et de fluorescence n'en demeurent pas moins des outils couramment utilisés afin de vérifier l'état d'agrégation de la chlorophylle. Ainsi, le spectre d'absorption de la chlorophylle mesuré "in vivo" présente un maximum à des longueurs d'onde supérieures aux valeurs mesurées pour des solutions diluées. Comparativement à la valeur de 661 nm rapportée pour la Chl a en solution dans le benzène (Seely et Jensen, 1965), les diverses formes de chlorophylle associées à la membrane du thylacoïde présentent des maxima compris entre 670 et 682 nm (Brown, 1983; Anderson et al. 1978; Brown et Choch, 1981). Ce déplacement du maximum d'absorption est expliqué par deux processus qui peuvent être indépendants ou concurrents soit : un accroissement de la polarité du milieu environnant et l'intensification des interactions chromophore-chromophore médiée par l'organisation des molécules de Chl a à l'intérieur du polypeptide. Nous avons utilisé la spectroscopie d'absorption afin de sonder l'état d'agrégation de la chlorophylle a au sein de l'association qu'elle forme avec la Pc d'oeuf. Les figures 4.1 et 4.3 présentent les spectres d'absorption obtenus pour la Chl a et le mélange Chl a -Pc (1:10), tous les deux mesurés à une pression de 20 mN m⁻¹. Le choix des phosphatidylcholines se base sur le degré d'insaturation des chaînes d'acide gras. Le spectre obtenu pour la Chl a est

conforme aux valeurs présentées par Heithier et al. (1983) . Deux différences majeures apparaissent lorsque la Pc est ajoutée à la Chl *a* : 1) le maximum d'absorption est déplacé vers de plus faibles longueurs d'onde et 2) l'intensité d'absorption est moindre . Ces deux effets sont la manifestation d'un même phénomène , c'est-à-dire la dilution de la Chl *a* par le lipide . Il est également possible de mesurer la même tendance lorsque la chlorophylle *a* est diluée avec une protéine formant un mélange miscible (Lamarche , 1988) . La bande de Soret a son sommet à 439.0 ± 0.5 nm avec un épaulement situé à 420.0 ± 0.5 nm . Ces valeurs concordent avec d'autres mesures effectuées à l'interface azote-eau (Agrawal et al. 1985) . La bande principale dans le rouge est située à 671.0 ± 0.5 nm . La position du premier satellite est à peu près constante , ceci indique que la transition S_0-S_1 est plus affectée par cet effet de dilution que ne l'est la bande de Soret . Ceci représente un déplacement de 10.0 ± 0.5 nm par rapport au spectre d'absorption du pigment pur . La diminution de l'absorption de 0.022 (Chl *a*) à 0.0010 (Chl *a*-Pc (1:10)) par monocouche est en accord avec le fait qu'en moyenne , l'aire moléculaire du système chromophore-lipide était , à cette pression de surface supérieure à l'aire mesurée pour la Chl *a* seule . Ainsi , la diminution de l'absorption est le reflet direct de la dilution du pigment .

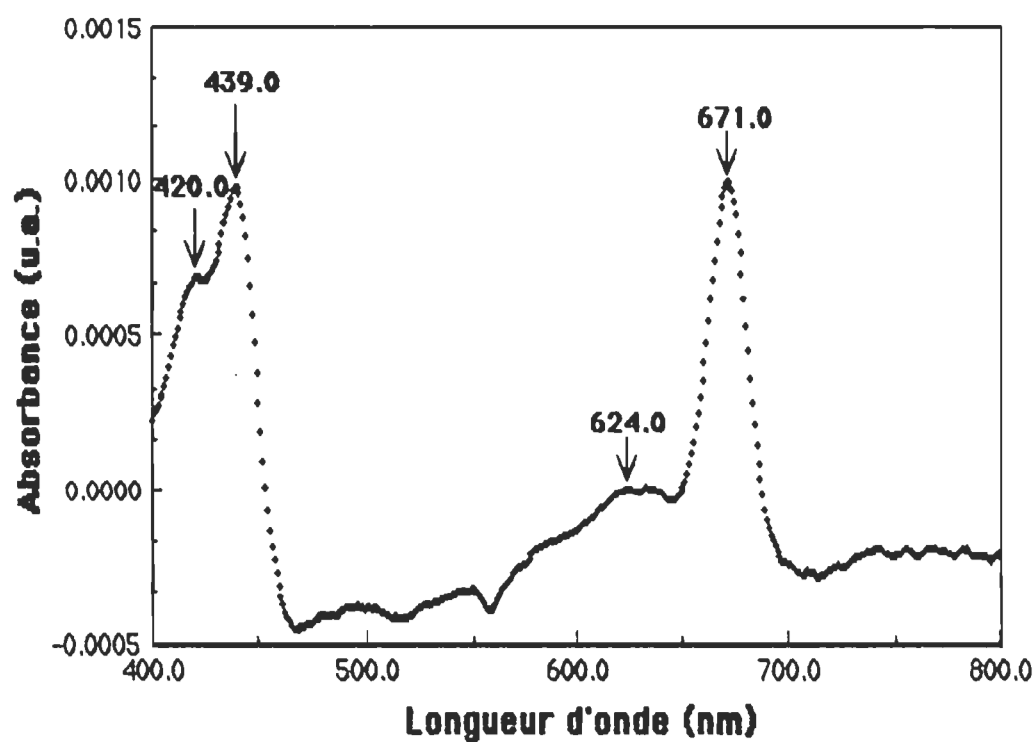


Figure. 4.3 : Spectre d'absorption d'une monocouche du mélange

Chl *a*-Pc (1:10) à l'interface air-eau

(température ambiante , la sous-phase est un

tampon phosphate avec un PH 8.0 ± 0.1 ,

40% d'humidité , la pression est de 20 mN m^{-1})

4.2 Interprétation des spectres de fluorescence

Les spectres de fluorescence des films L-B ont été mesurés sur notre système et sur le spectrofluorolog II . Les deux spectrofluorimètres présentent les mêmes caractéristiques optiques , sauf que celui mis au point dans notre laboratoire a été adapté pour mesurer les spectres de fluorescence à l'interface air-eau .

4.2.1 Cas de la Chl a pure (À l'interface air-eau et en films L-B)

Les spectres d'émission d'une monocouche de chlorophylle a déposée à la surface de l'eau et en films L-B sont présentés aux figures 4.4 et 4.5 . Pour les films L-B , on mesure le spectre d'émission pour une monocouche de chaque côté de la lame de quartz . Les spectres d'émission pour une monocouche à l'interface air-eau et en film L-B présentent une large bande dont les maximums sont situés respectivement à 700.0 ± 0.5 nm et 704.0 ± 0.5 nm .

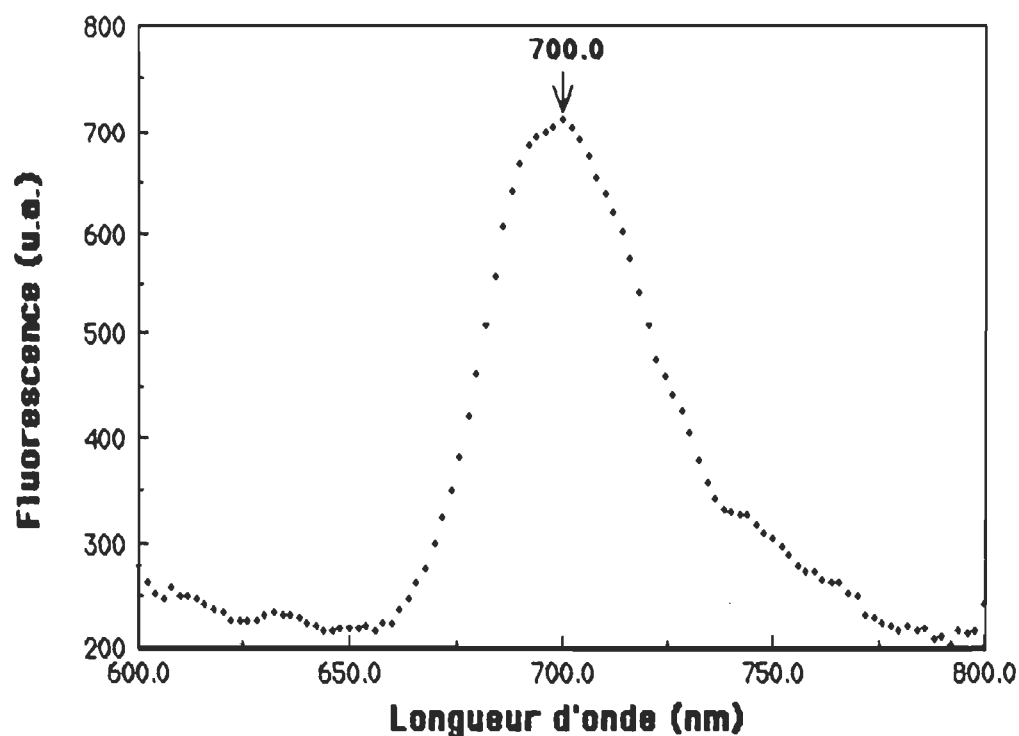


Figure. 4.4: Spectre de fluorescence d'une monocouche de Chl a
à l'interface air-eau

(température ambiante $T=20\pm 1$ °C, la sous-phase
est un tampon phosphate avec un PH 8.0 ± 0.1 , 40%
d'humidité , la pression de surface
est de 20 mN m^{-1})

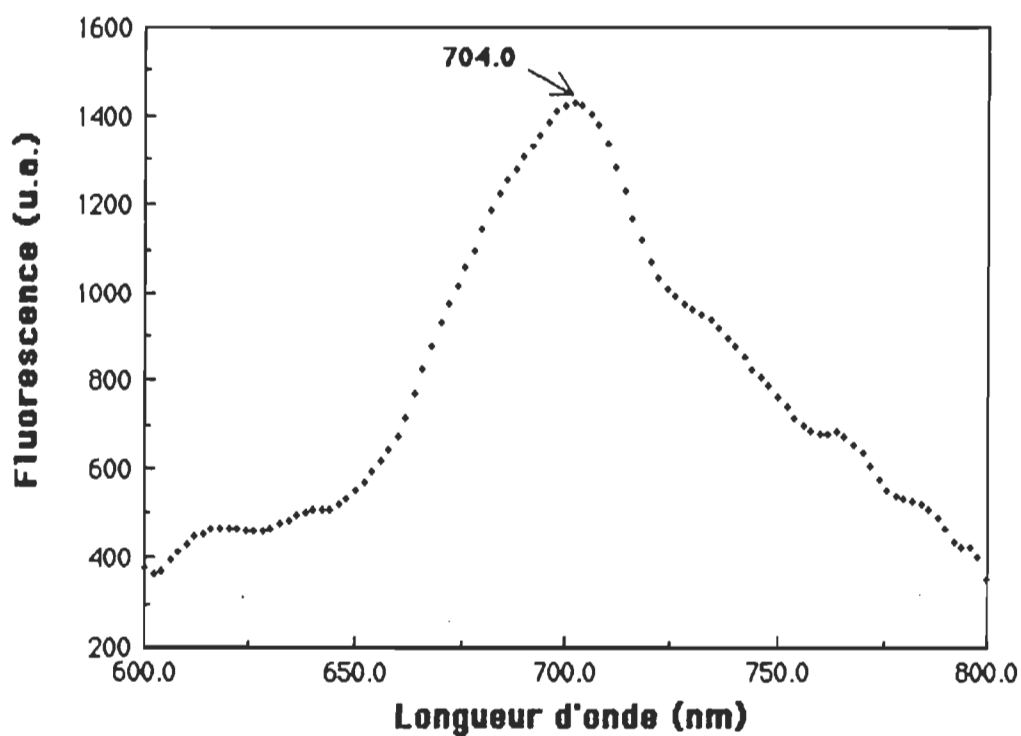


Figure. 4.5 : Spectre de fluorescence de la Chl a pour un film L-B

(une monocouche de chaque côté de la lame ,
température ambiante , la sous-phase est un
tampon phosphate avec un PH 8.0 ± 0.1 , 40%
d'humidité , la pression de surface est de
 20 mN m^{-1} , vitesse de déposition
est de 1 cm mn^{-1})

4.2.2 Cas de dilution de la Chl *a* par la Pc d'oeuf (1:10)

Une confirmation supplémentaire de l'effet diluant de la Pc (d'oeuf) incorporée dans une monocouche de Chl *a* est donnée par les spectres d'émission de fluorescence (figures 4.6 et 4.7). Il est important de préciser dans un premier temps que l'intensité de fluorescence est fort variable pour des films de même nature. Ainsi, il est impossible d'obtenir une série de spectres présentant des intensités de fluorescence reproductibles. Ce phénomène demeure inexpliqué. Nous avons cependant noté que l'intensité de fluorescence du système mixte Chl *a*-Pc est plus élevée que celle mesurée pour la Chl *a* seule.

Le mélange binaire composé de Chl *a*-Pc d'oeuf permet l'étude du comportement du pigment dans cet environnement lipidique. Les spectres de fluorescence de la Chl *a* diluée par la Pc d'oeuf pour une concentration de 1:10 sont présentés respectivement aux figures 4.6 et 4.7 pour une monocouche déposée à la surface de l'eau et en film L-B (une monocouche de chaque côté de la lame de quartz). Les maximums se situent à 676.0 ± 0.5 nm et 678.0 ± 0.5 nm respectivement. Toutes les phosphatidylcholines synthétiques mélangées avec la Chl *a* présentent un spectre identique à celui que nous avons observé pour une monocouche de Chl *a*-Pc (1:10) à l'interface air-eau. Cette observation expérimentale appuie les résultats de Picard (1990).

Les résultats obtenus "in vivo" comme les résultats obtenus pour le système modèle fournissent cependant peu d'informations concernant la nature réelle

du complexe . D'ailleurs , les spectres de fluorescence rapportés pour les chloroplastes ou les constituants se limitent à une interprétation phénoménologique . Dans le cas qui nous concerne , l'ensemble des résultats obtenus par spectroscopies d'absorption et de fluorescence confirment la dilution de la monocouche de Chl a par la Pc .

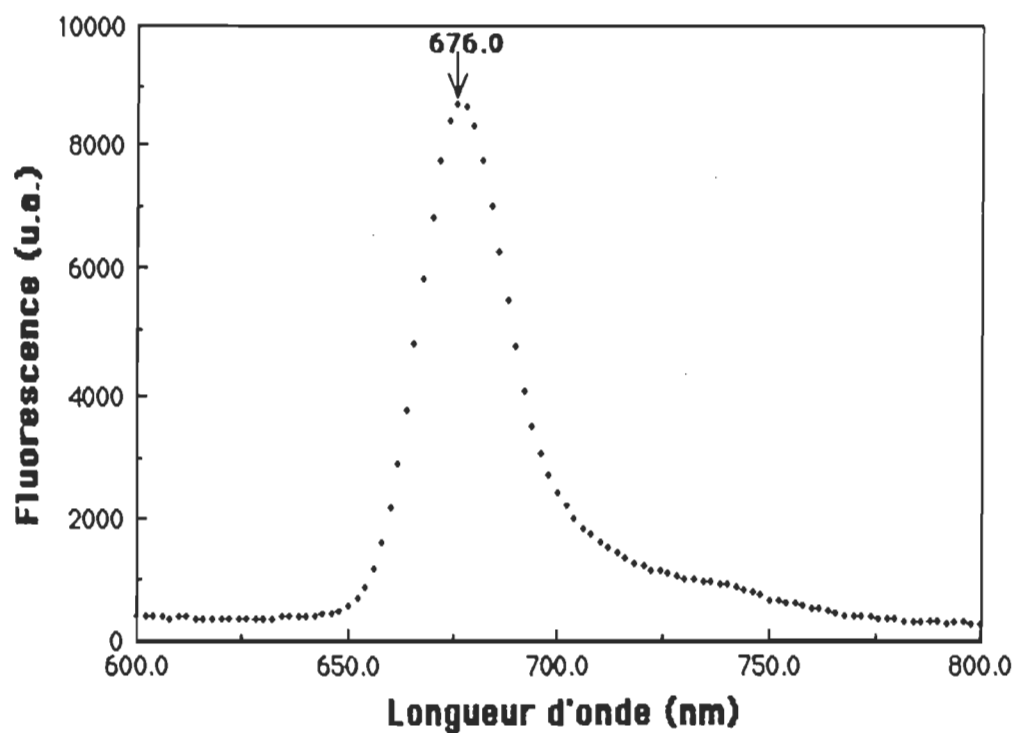


Figure. 4.6 : Spectre de fluorescence d'une monocouche du mélange Chl *a*-Pc (1:10) à l'interface air-eau (température ambiante , la sous-phase est un tampon phosphate avec un PH 8.0 ± 0.1 , 40% d'humidité , la pression est de 20 mN m^{-1})

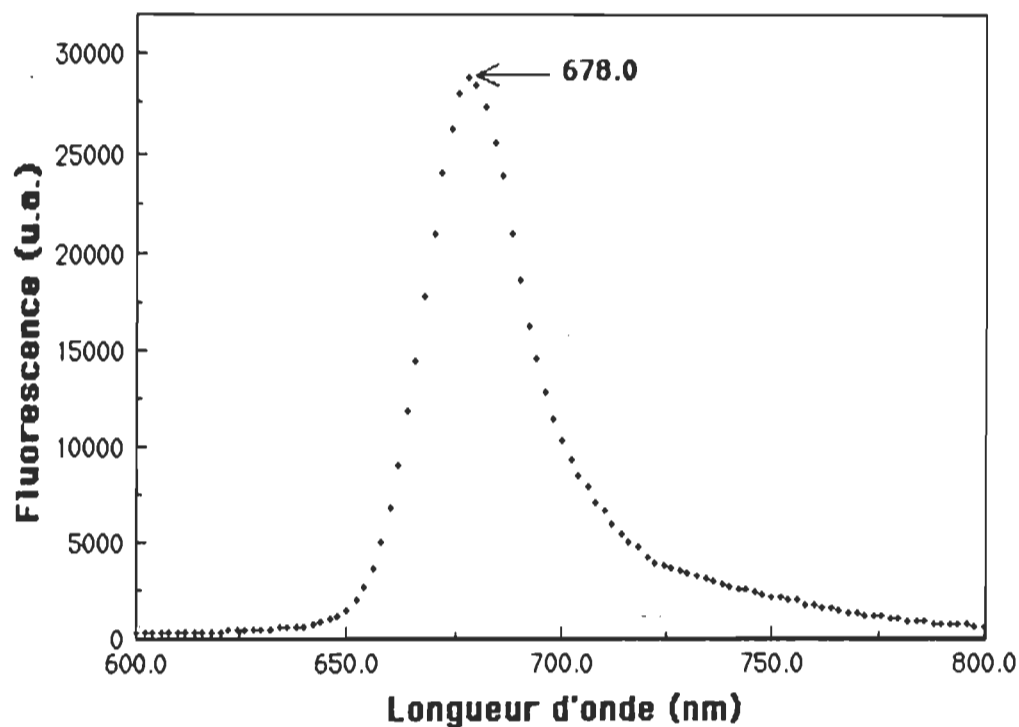


Figure. 4.7 : Spectre de fluorescence du mélange Chl *a*-Pc
(1:10) pour un film L-B

(une monocouche de chaque côté de la lame ,
température ambiante , la sous-phase est un
tampon phosphate avec un PH 8.0 ± 0.1 , 40%
d'humidité , la pression de surface est de
 20 mN m^{-1} , vitesse de déposition
est de 1 cm mn^{-1})

CONCLUSION

De nombreuses études spectroscopiques sur les systèmes modèles de la Chl *a* ont été effectuées au cours des dernières années afin de caractériser l'état de la Chl *a* responsable de la haute efficacité de la séparation de charges. L'interprétation des spectres de la Chl *a* dans les systèmes *in vitro* permettait ainsi l'acquisition de nouvelles connaissances qui pouvaient mener à la caractérisation de l'état de la Chl *a* retrouvée *in vivo*. Nous avons réussi à mettre au point un spectromètre permettant de mesurer directement les propriétés optiques de la chlorophylle *a* à l'interface air-eau afin de simuler l'état d'agrégation de ce pigment dans la membrane biologique. De plus, pour un même film monomoléculaire on peut mesurer les propriétés spectrales en terme d'absorption et de fluorescence respectivement l'une après l'autre et ce en préservant l'arrangement des molécules dans le film. La stabilité sur l'absorbance de la monocouche laissée à une pression de surface de 20 mN m^{-1} pendant une durée de temps d'une heure est de l'ordre de $1 \times 10^{-4} \text{ u.a.}$; quant au bruit à 500 nm il est de $1 \times 10^{-5} \text{ u.a.}$. Les mesures expérimentales nous ont permis d'observer un rapport signal sur bruit de 0.31×10^2 dans la région des longueurs d'onde 620 à 660 nm pour la fluorescence. Ces caractéristiques montrent un niveau de performance de notre spectromètre supérieure à celles publiées jusqu'à date. Nous avons mesuré les propriétés d'absorption et de fluorescence à l'interface air-eau pour la chlorophylle *a* ainsi que le mélange chlorophylle *a* - phosphatidylcholine d'oeuf. Les propriétés ainsi mesurées reproduisent celles obtenues pour les mêmes systèmes biologiques organisés, mais en films Langmuir-Blodgett.

BIBLIOGRAPHIE

- Agrawal, M.L., Chauvet, J.-P. et Patterson, L.K., Effects of molecular organization on photophysical behavior : lifetime and steady-state fluorescence of chlorophyll a singlets in monolayers of dioleoylphosphatidylcholine at the nitrogen-water interface., J. Phys. Chem., 1985, 89, 2979-2982 .
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roff, M., Robert, K., et Watson, J.D., Molecular biology of the cell, New York : Garland , 1983.
- Andelman, A., Brochard, F. et Joanny, J. F., Modulated structures and competing interactions in amphiphilic monolayers., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1987, 84, 4717-4718 .
- Anderson, P. A. et Evett, A. A., Automatic recording of the pressure-area , pressure-time , and area-time characteristics of monomolecular films., Rev. Sci. Instrum., 1952, 23, 485-488.
- Anderson, J. M., Waldron, J. C. et Thorne, S. W., Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids . Spectral characterization of six complexes resolved by electrophoretic procedure., FEBS Letters, 1978, 92, 227-233 .
- Arnon, D.I., Photosynthetic CO₂ assimilation by chloroplasts : assertion , refutation , discovery., Trends Biochem. Sci., 1987, 12, 39-42 .

- Barraud, A., La technique de Langmuir-Blodgett : Un outil pour l'ingénierie supramoléculaire en film mince., J. chim. phys., 1987, 84, 1105-1111.
- Batey, J., Petty, M. C. et Roberts, G. G., Electroluminescent MIS structures incorporating Langmuir-Blodgett films., Insulating Films on Semiconductors, Elsevier Sc., 1983, 141-144.
- Bellamy, W. D., Gaines jr, G.L. et Tweet, A.G., Preparation and properties of monomolecular films of chlorophyll a and pheophytin a., J. Chem. Phys., 1963, 39, 2528-2538.
- Breton, J., Villaz, M.M., Paillotin, G. et Vandervyver, M., Application of linear dichroism to the study of the distribution of pigments in monomolecular layers., Thin Solid Films, 1972, 13, 351-357.
- Brown, J. S., A new evaluation of chlorophyll absorption in photosynthetic membranes., Photosynthesis Res., 1983, 4, 375-383.
- Brown, J. S. et Choch, S., Spectral analysis of chlorophyll-protein complexes from higher plant chloroplasts., Biochim. Biophys. Acta., 1981, 636, 201-209.
- Caillé, A. et Argen, G., Transition de phase dans une monocouche monomoléculaire sur un substrat liquide adhésif., Can. J. Phys., 1975, 53, 2369-2374.
- Chan, W. K., Cox, H. M., Abeles, J. H. et Keltly, S. P., Langmuir-Blodgett deposited cadmium gate inverted InP-GaInAs modulation-doped field-effect transistors., Electron. Lett., 1987, 23, 1346-1348.

- Chauvet, J. P. et Patterson, L.K., Measurement of fluorescence depolarisation for chlorophyll a and chlorophyll b in spread monolayers at the nitrogen-water interface., Thin Solid Films, 1966, 159, 149-157 .
- Clayton, R.K., Photosynthesis : Physical mechanisms and chemical pattern., Cambridge : Cambridge University Press , 1980.
- De costa, S.M., Froines, J.r., Harris, J.M., Leblanc, R.M., Orger, B.H. et Porter, G., Model systems for photosynthesis III. Primary photoprocesses of chloroplast pigments in monomolecular arrays on solid surfaces., Proc. R.Soc. Lond., 1972, 326, 503-515.
- Désormaux, A. et Leblanc , R.M., Electronic and photoacoustic spectroscopies of chlorophyll a in monolayer and multilayer arrays., Thin Solid Films., 1985, 132, 91-99 .
- Duysens, L. N. M., Ames, J. et Kamp, B. M., Two photochemical systems in photosynthesis., Nature., 1961, 190, 510-511 .
- Fromherz, P., Instrumentation for handling monomolecular films at an air-water interface., Rev. Sci. Instrum., 1975, 46, 1380-1385 .
- Frommer, M. A. et Miller, I. R., Simple fully automatic recording surface balance., Rev. Sci. Instrum., 1965, 36, 707-708 .
- Gaines Jr, G. L., Insoluble monolayers at the liquid-gas interfaces., Interscience Publishers, New York, 1966 .

- Gallant, J., Purification des lipides du chloroplaste par chromatographie liquide à haute performance et études spectroscopiques des mélanges chlorophyll a/lipides à l'état monomoléculaire, Mémoire présenté à l'U.Q.T.R., Trois-Rivières, 1990 .
- Guastalla, J., Surface balance with a pendulous suspension., Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, 1939, 208, 973-975 .
- Heithier, H., Ballschmiter, K. et Möhwald, H., Liquid-crystalline phase transition of monomolecular layers of chlorophyll a., Photochem. Photobiol., 1983, 37, 201-205 .
- Hong, K. et Rubner, M. F., Synthesis of electrically conductive polypyrroles at the air-water interface of Langmuir-Blodgett film balance., Thin Solid Films., 1988, 160, 187-195 .
- Iriyama, K. et Yoshiura, M., Separation of Chlorophyll a and Chlorophyll b by column chromatography with Sephadex LH-20 or powdered sugar., J. Chromatogr., 1979, 117, 154-156 .
- Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids., J. Am. Chem. Soc., 1917, 39, 1848-1906 .
- Lamarche, F., Une approche permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine à l'interface air-eau, Thèse de doctorat présentée à l'U.Q.T.R., Trois-Rivières, 1988.
- Lamarche, F., Picard, G., Leblanc, R. M. et Aghion, J. , Monolayer studies of binary systems made of biomembrane lipids-analogues, of cytochrome c

and of chlorophyll a dans S. Hayano (Ed)., Proceedings ISF-JOCS world congress, 1988, Tokyo : the Japan Oil Chemists' Society, 1989, 2, 755-760.

Lehninger, A.L., Biochimie, Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1970.

Lehninger, A.L., Principles of biochemistry, New York : Worth Publishers Inc., 1982.

Mann, J. Jr. et Hansen, R. S., A simple technique for the automatic recording of monolayer compression characteristics., Rev. Sci. Instrum., 1960, 31, 961-963 .

Milonni, P.W. et Eberly, J. H., Lasers, New York : Willey and Sons, 1988 .

Munger, G., Lorrain, L., Gagné, G. et Leblanc, R. M., Adjustable speed and vibration-free hydraulic system for Langmuir-Blodgett films deposition., Rev.Sci.Instrum., 1987, 58, 285-288 .

Nishikata, Y., Morikawa, A., Takiguchi, Y., Kanemoto, A., Kakimoto, M. A. et Imai, Y., Electrooptic bistability and threshold characteristics of ferroelectric liquid crystal cell possessing polyimide Langmuir-Blodgett film as an aligning layer., Jpn. J. Appl. Phys., 1988, 27, L1163-L1164 .

Nobel, P. S., Biophysical plant physiology and ecology (3d ed)., Freeman , San Francisco , 1983 .

Ogawa, K., Tamura, H., Sasago, M. et Ishihara, T., SPIE, 771, Advances in Resist Technology and Processing IV., 1987, 39 .

- Omata, T. et Murata, N., A rapid and efficient method to prepare chlorophyll a and b from leaves., Photochem. Photobiol. , 1980, 31 , 183-185 .
- Picard, G., L'effet de l'environnement lipidique et protéique sur la durée de vie de fluorescence de la chlorophylle a en film monomoléculaire et Langmuir-Blodgett., Thèse de doctorat présentée à l'U.Q.T.R., Trois-Rivières, 1990 .
- Picard, G., Aghion, J., Le crom, C., Leblanc, R. M., Fluorescence properties of Langmuir-Blodgett films of chlorophyll a mixed with membrane lipids., Thin Solids Films., 1989, 180, 31-42 .
- Picard, G., Munger, G., Leblanc, R.M., Le Sage, R., Sharma, D.K., Siermiarczuk, A. et Bolton, J.R., Fluorescence lifetime of chlorophyll a in pure and mixed L-B films., Chem. Phys. Lett., 1986, 129, 41-47 .
- Robert, S., Transferts d'électrons entre la chlorophylle a et la plastoquinone-9 incorporées dans les membranes planaires asymétriques., Thèse de doctorat présentée à l'U.Q.T.R. , Trois-Rivières, 1987 .
- Seely, G. R. et Jensen, R. G., Effect of solvent on the spectrum of chlorophyll., Spectrochim. Acta., 1965, 21, 1835-1845 .
- Silver, B. L. (Ed)., The physical chemistry of membranes., The Solomon Press., New York, 1985 .

- Sugawara, M., Kataoka, M., Odashima, K. et Umezawa, Y., Biomimetic ion channel sensors based on host-guest molecular recognition in Langmuir-Blodgett membrane assemblies., Thin Solid Films., 1989, 180, 129-133 .
- Tazi, A., Étude , à l'aide de dichroïsme linéaire et de fluorescence polarisée , de l'organisation des pigments photosynthétiques des thylacoides d'orge alignés dans des films d'alcool de polyvinyl., Mémoire présenté à l'U.Q.T.R., Trois-Rivières , 1991 .
- Thornber, J. P., Markwell, J. P. et Reinman, S., Plant chlorophyll-protein complexes., Photochem. Photobiol., 1979, 29, 1205-1216 .
- Thornber, J.P., Peter, G.F. et Nechushtal, R., Biochemical composition and structure of photosynthetic pigments-proteins from higher plants., Physiol. Plantarum., 1987, 71, 236-242 .
- Turnit, H. J. et Lauer, W. E., Automatic recording film balance system., Rev. Sci. Instrum., 1959, 30, 975-981 .
- Uekita, M., Awaji, H., Murata, M. et Mizunuma, S., Application of polyimide Langmuir-Blodgett films to deep UV resists., Thin Solid Films., 1989, 180, 271-276 .
- Velthuys, B.R., Mechanisms of electron flow in photosystem II and toward photosystem I., Ann. Rev. Plant. Physiol., 1980, 31, 545-567 .
- Vernon, L. P. et Seely, G.R. (Eds.), The chlorophylls., Academic Press Inc., New York, 1966 .